บทที่ 3

ผลการวิจัย

1. การคัดเลือกยีสต์ที่สามารถเติบโตและผลิตกรดบนอาหารแข็งที่มีนอร์มัล พาราฟฟินส์เป็นเป็นแหล่งคาร์บอน

1.1 การคัดเลือกยีสต์สายพันธุ์ที่สามารถเติบโตบนอาหารแข็งที่มีนอร์มัลพาราฟฟินส์เป็นแหล่งคาร์บอน

จากการคัดเลือกยีสต์จำนวน 25 สายพันธุ์บนอาหารแข็งที่มีนอร์มัลพาราฟฟินส์เป็นแหล่งคาร์บอน เปรียบเทียบกับอาหารแข็งสูตรเดียวกันแต่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน (ภาคผนวกที่ 1.3) ตามวิธีการทดลองในข้อ 2.4.1 พบว่ายีสต์ทั้ง 25 สายพันธุ์สามารถเติบโตโดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน แต่ยีสต์จำนวน 16 สายพันธุ์เท่านั้น(ดังแสดงในตารางที่ 8) สามารถเติบโตโดยใช้นอร์มัล พาราฟฟินส์เป็นแหล่งคาร์บอนได้ โดยสังเกตได้จากการเกิดโคโลนีของยีสต์ขึ้นอย่างเห็นได้ชัดเจนด้วยตาเปล่าบนอาหารแข็งนั้น

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 8 ยีสต์สายพันธุ์ต่างๆ ที่สามารถเติบโตโดยใช้นอร์มัล พาราฟฟินส์เป็นแหล่งคาร์บอนบนอาหารแข็ง

ชื่อสายพันธุ์	การเติบโต	ชื่อสายพันธุ์	การเติบโต
Candida tropicalis 5031	+	Toruropsis glabrata 5241	-
Candida utilis 5032	-	Candida tropicalis 5268	+
Candida tropicalis 5045	+	Candida sp.5289	+
Candida tropicalis 5054	+	Candida tropicalis 5299	+
Candida pulcherrima 5120	-	Candida sp.5319	-
Candida parapsilosis 5126	+	Candida sp.5327	+
Pichia guilliermondii 5142	+	Candida catenulata Y-311	-
Candida sp.5143	-	Candida guilliermondii Y-488	-
Candida tropicalis 5171	+	Candida lipolytica Y-1095	+
Candida tropicalis 5174	+	Candida intermedia Y1512	-
Candida guilliermondii 5206	+	Candida lipolytica C-24	+
Cryptococcus albidus 5211	-	Candida oleophila C-73	+
Yarrowia lipolytica 5212	+		

หมายเหตุ

เครื่องหมายบวก(+)หมายถึง ยีสต์สายพันธุ์ที่สามารถเติบโตได้บนอาหารแข็งที่มีนอร์มัล พาราฟฟินส์เป็นแหล่งคาร์บอน

เครื่องหมายลบ (-)หมายถึง ยีสต์สายพันธุ์ที่ไม่สามารถเติบโตบนอาหารแข็งที่มีนอร์มัล พาราฟฟินส์เป็นแหล่งคาร์บอน

1.2 การคัดเลือกยีสต์สายพันธุ์ที่สามารถผลิตกรดได้บนอาหารแข็ง

ในการคัดเลือกเบื้องต้นเพื่อหายีสต์สายพันธุ์ที่สามารถผลิตกรดได้ จะคัดเลือกโดยใช้อาหารแข็งที่มีโบรโมคลีซอลกรีนเป็นอินดิเคเตอร์ ซึ่งเป็นวิธีการทดลองที่ดัดแปลงมาจากวิธีของ J.W. Foster[57] ซึ่งใช้คัดเลือกเชื้อราที่สามารถผลิตกรดได้ โดยอาศัยการเปลี่ยนสีของโบรโมคลีซอลกรีน (มีช่วงการเปลี่ยนสีที่ค่าความเป็นกรดด่างระหว่าง 5.4-3.8) จากสีน้ำเงินอมฟ้าเป็นสีเหลืองเมื่อมีกรดเกิดขึ้น

เลี้ยงยีสต์สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 1.1 บนอาหารแข็งที่มีนอร์มัลพาราฟฟินส์เป็นแหล่งคาร์บอน เปรียบเทียบกับอาหารแข็งสูตรเดียวกันแต่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน (ภาคผนวกที่ 1.4) ตามวิธีการทดลองในข้อ 2.4.2 ผลการวิจัยดังแสดงในตารางที่ 9 พบว่า ยีสต์ทั้ง 25 สายพันธุ์จากข้อ 1.1 ที่เติบโตได้บนอาหารแข็งที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนและยีสต์ 16 สายพันธุ์จากข้อ 1.1 ที่เติบโตได้บนอาหารแข็งที่มีนอร์มัลพาราฟฟินส์เป็นแหล่งคาร์บอน สามารถเปลี่ยนสีของอินดิเคเตอร์จากสีน้ำเงินอมฟ้าเป็นสีเหลืองรอบๆ โคโลนีของยีสต์ แสดงได้ว่ายีสต์สายพันธุ์ดังกล่าวสามารถผลิตกรดได้ แต่อย่างไรก็ตามเราไม่สามารถชี้ได้แน่ชัดว่าสายพันธุ์ใดผลิตกรดมะนาวได้ ดังนั้นการวิจัยขั้นต่อไปจะเป็นการคัดเลือกยีสต์สายพันธุ์ที่สามารถผลิตกรดมะนาวในอาหารเหลวได้เท่านั้น

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 9 ยีสต์สายพันธุ์ต่างๆ ที่สามารถผลิตกรดได้บนอาหารแข็งโดยใช้โบรโมคลีซอลกรีนเป็นอินดิเคเตอร์

ชื่อสายพันธุ์	การเปลี่ยนสีจากสีน้ำเงินอมฟ้าเป็นสีเหลือง	
	กลูโคส	นอร์มัล พาราฟฟินส์
Candida tropicalis 5031	+	+
Candida utilis 5032	+	–
Candida tropicalis 5045	+	+
Candida tropicalis 5054	+	+
Candida pulcherrima 5120	+	–
Candida parapsilosis 5126	+	+
Pichia guilliermondii 5142	+	+
Candida sp.5143	+	–
Candida tropicalis 5171	+	+
Candida tropicalis 5174	+	+
Candida guilliermondii 5206	+	+
Cryptococcus albidus 5211	+	–
Yarrowia lipolytica 5212	+	+
Toruropsis glabrata 5241	+	–
Candida tropicalis 5268	+	+
Candida sp.5289	+	+
Candida tropicalis 5299	+	+
Candida sp.5319	+	–
Candida sp.5327	+	+
Candida catenulata Y-311	+	–
Candida guilliermondii Y-488	+	–
Candida lipolytica Y-1095	+	+
Candida intermedia Y-1512	+	–
Candida lipolytica C-24	+	+
Candida oleophila C-73	+	+

หมายเหตุ

เครื่องหมายบวก(+) หมายถึง ยีสต์สายพันธุ์ที่สามารถเปลี่ยนสีของโบรโมคลีซอลกรีนจากสีน้ำเงินอมฟ้าเป็นสีเหลือง

เครื่องหมายลบ(-) หมายถึง ยีสต์สายพันธุ์ที่ไม่สามารถเปลี่ยนสีของโบรโมคลีซอลกรีนจากสีน้ำเงินอมฟ้าเป็นสีเหลือง

2. การคัดเลือกยีสต์สายพันธุ์ที่สามารถผลิตกรดมะนาวได้สูงสุดในอาหารเหลว

ในการคัดเลือกยีสต์สายพันธุ์ที่เหมาะสมเพื่อนำไปใช้ในการศึกษาการผลิตกรดมะนาวนั้น เราจะมุ่งเน้นไปถึงยีสต์สายพันธุ์ที่สามารถใช้นอร์มัล พาราฟฟินส์เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตกรดมะนาวได้ และเปรียบเทียบการผลิตกรดมะนาวในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนตามสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อในภาคผนวกที่ 1.5 ซึ่งจากการเลี้ยงยีสต์สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 1.2 ตามวิธีการทดลองในข้อ 2.5 โดยมีนอร์มัล พาราฟฟินส์ หรือกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน วิเคราะห์หาปริมาณกรดมะนาวโดยวิธีเพนตาโบรโมอะซีโตนตามวิธีการทดลองในข้อ 2.3.2และติดตามการเติบโตของเชื้อโดยหาน้ำหนักเซลล์แห้งตามวิธีการทดลองในข้อ 2.3.1.2 พบว่ายีสต์จำนวน 11 สายพันธุ์สามารถผลิตกรดมะนาวได้ ในจำนวนนี้ยีสต์ 7 สายพันธุ์สามารถผลิตกรดมะนาวได้ทั้งในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีนอร์มัล พาราฟฟินส์ หรือกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน และยีสต์อีก 4 สายพันธุ์ สามารถผลิตกรดมะนาวได้เฉพาะในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนเท่านั้น นอกจากนี้แล้วพบว่ายีสต์ Candida oleophila C-73 เป็นสายพันธุ์ที่มีการผลิตกรดมะนาวได้สูงสุดจากแหล่งคาร์บอนทั้งสองชนิดคือ 29.5 กรัมต่อลิตรในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีนอร์มัลพาราฟฟินส์เป็นแหล่งคาร์บอนหรือ 27.0 กรัมต่อลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนดังแสดงในตารางที่ 10 ฉะนั้นในการวิจัยขั้นต่อไป จะใช้ Candida oleophila C-73ในการศึกษาเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดมะนาวต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

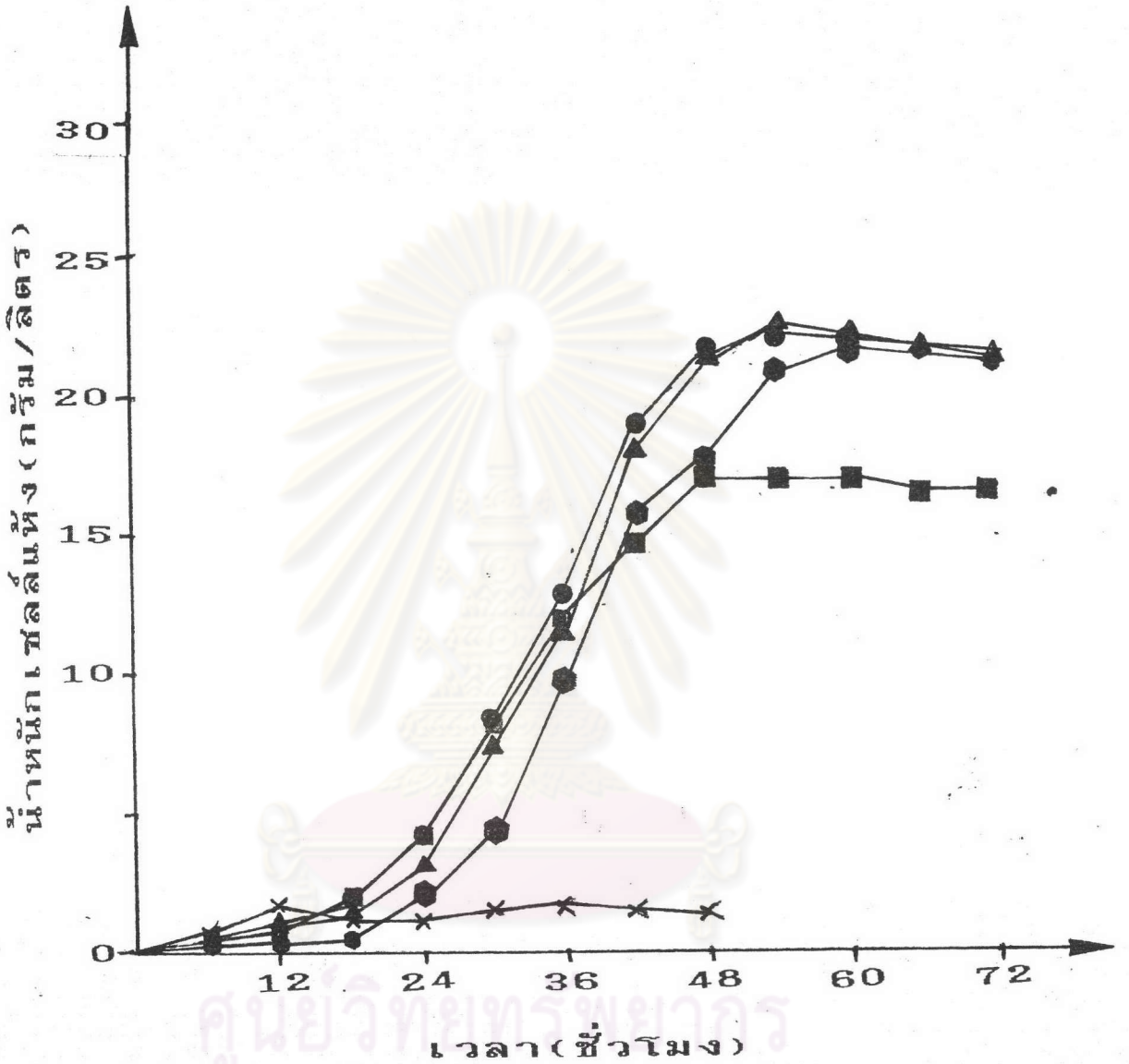
ตารางที่ 10 การผลิตกรดมะนาวโดยยีสต์สายพันธุ์ต่างๆ

ยีสต์	แหล่งคาร์บอน			
	นอร์มัล พาราฟฟินส์		กลูโคส	
	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	ปริมาณกรดมะนาว (กรัม/ลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	ปริมาณกรดมะนาว (กรัม/ลิตร)
C.tropicalis 5031	6.1	0.0	11.5	5.7
C.tropicalis 5054	3.5	0.9	12.8	10.2
C.pulcherrima 5120	0.0	0.0	10.6	7.5
C.parapsilosis 5126	15.3	0.0	17.3	15.0
C.guilliermondii 5206	22.7	5.4	16.4	9.0
Y.lipolytica 5212	19.8	8.1	14.4	21.0
C.sp. 5327	14.5	1.5	17.5	12.5
C.guilliermondii Y-488	0.0	0.0	18.3	13.5
C.lipolytica Y-1095	24.5	15.8	12.5	24.6
C.lipolytica C-24	20.6	19.2	15.8	15.0
C.oleophila C-73	23.4	29.5	17.8	27.0

3. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมหัวเชื้อ Candida oleophila C-73

3.1 ผลของแคลเซียมคาร์บอเนต

เลี้ยงยีสต์ Candida oleophila C-73 ในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ โดยแปรผันความเข้มข้นของแคลเซียมคาร์บอเนตตั้งแต่ร้อยละ 0.0 0.5 1.0 1.5และ 2.0 (น้ำหนักต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ) ตามวิธีการทดลองในข้อที่ 2.6.1.1 ซึ่งมีความเข้มข้นของนอร์มัลพาราฟฟินส์ร้อยละ 3.0(น้ำหนักต่อปริมาตร)เป็นแหล่งคาร์บอน เลี้ยงเชื้อโดยการเขย่าให้อากาศแบบวงกลมด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 °ซ. ติดตามการเติบโตของยีสต์ตามวิธีการทดลองในข้อที่ 2.3.1 ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 8 ซึ่งเห็นได้ชัดว่ารูปแบบการเติบโตของยีสต์ Candida oleophila C-73 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตเปรียบเทียบกับการเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีแคลเซียมคาร์บอเนต มีลักษณะแตกต่างกันมาก ในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อที่ไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต การเติบโตของ Candida oleophila C-73 จะหยุดชะงักลงภายในเวลา 12 ชั่วโมง หลังการถ่ายเชื้อลงไปในอาหาร โดยมีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเพียง 1.75 กรัมต่อลิตร แต่เมื่อเติมแคลเซียมคาร์บอเนตลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน น้ำหนักเซลล์แห้งจะเพิ่มมากขึ้น โดยจะเห็นได้ว่าที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 หรือ 1.0(น้ำหนักต่อปริมาตร) เชื้อมีรูปแบบการเติบโตคล้ายคลึงกัน แต่ที่ความเข้มข้นของแคลเซียมคาร์บอเนตเท่ากับร้อยละ 0.5 เมื่อเชื้อเติบโตเต็มที่ น้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้น้อยกว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 1.0 อยู่ประมาณ 1.3 เท่า ส่วนที่ความเข้มข้นของแคลเซียมคาร์บอเนตเท่ากับร้อยละ 1.5 การเติบโตของเชื้อ Candida oleophila C-73 จะใกล้เคียงกับอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตความเข้มข้นร้อยละ 1.0 แต่เมื่อเพิ่มปริมาณขึ้นเป็นร้อยละ 2.0 การเติบโตของยีสต์จะลดลง และช้ากว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 1.0 ซึ่งเชื้อจะถึงระยะคงตัว(stationary phase)ภายหลัง 48 ชั่วโมงหลังการเลี้ยงเชื้อ โดยที่น้ำหนักเซลล์แห้งจะมากกว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตอยู่ถึง 15 เท่าและมีระยะกึ่งกลางของการเจริญแบบทวีคูณ(mid-log phase)ที่ช่วงเวลา 30-36 ชั่วโมง หลังการเลี้ยงเชื้อ ดังนั้นในการวิจัยขั้นต่อไปจะเติมแคลเซียมคาร์บอเนตความเข้มข้นร้อยละ 1.0 ลงในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ



รูปที่ 8 ผลของปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตต่อการเติบโตของเชื้อ Candida oleophila C-73 ในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ

× = ชุดควบคุม(ไม่มีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนต)

■ = แคลเซียมคาร์บอเนตความเข้มข้นร้อยละ 0.5 (น้ำหนักต่อปริมาตร)

● = แคลเซียมคาร์บอเนตความเข้มข้นร้อยละ 1.0 (น้ำหนักต่อปริมาตร)

▲ = แคลเซียมคาร์บอเนตความเข้มข้นร้อยละ 1.5 (น้ำหนักต่อปริมาตร)

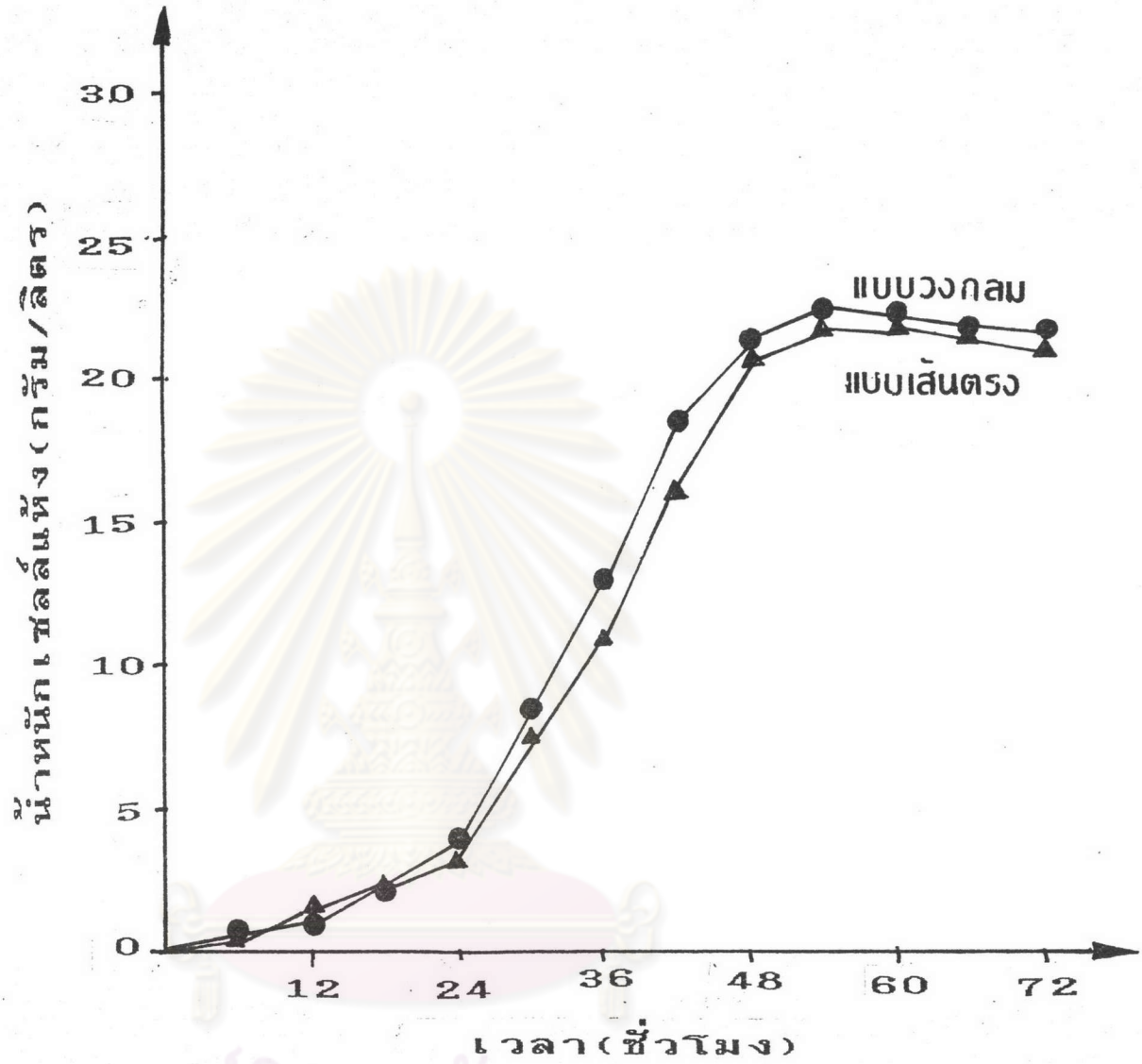
⬢ = แคลเซียมคาร์บอเนตความเข้มข้นร้อยละ 2.0 (น้ำหนักต่อปริมาตร)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2 ผลของลักษณะการเขย่า

เลี้ยงยีสต์ Candida oleophila C-73 ในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ (สูตรอาหารในภาคผนวกที่ 1.6) ตามวิธีการทดลองในข้อที่ 2.6.1.2 เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30°ซ เขย่าให้อากาศแบบวงกลมเปรียบเทียบกับการเขย่าแบบเส้นตรงด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที ติดตามการเติบโตของเชื้อทุก 6 ชั่วโมง ตามวิธีการทดลองในข้อ 2.3.1 พบว่าเมื่อเขย่าให้อากาศด้วยความเร็วรอบเท่ากัน ยีสต์ Candida oleophila C-73 มีรูปแบบการเติบโตคล้ายคลึงกัน แต่การเติบโตของเชื้อที่เขย่าให้อากาศแบบวงกลมจะมีมากกว่าการเติบโตของเชื้อ ที่เขย่าให้อากาศแบบเส้นตรงเล็กน้อยดังแสดงในรูปที่ 9 และนอกจากนั้นแล้ว การเขย่าแบบเส้นตรงจะทำให้เกิดการกระเด็นของนอร์มัล พาราฟฟินส์ที่ลอยอยู่ที่ผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อไปติดตามผนังของภาชนะที่บรรจุ หรือขวดทดลองมากกว่าการเขย่าให้อากาศแบบวงกลม ทำให้เกิดการสะสมของแคลเซียมคาร์บอเนตที่ไม่ละลายน้ำ และเซลล์ของยีสต์เกาะติดผนังขวดทดลองมากกว่า เป็นเหตุให้เซลล์ที่อยู่ในสารละลายน้อยลง ซึ่งไม่เหมาะสมสำหรับการเตรียมหัวเชื้อ ดังนั้นจึงเลือกการเขย่าให้อากาศแบบวงกลมสำหรับการเพาะเลี้ยงเชื้อต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



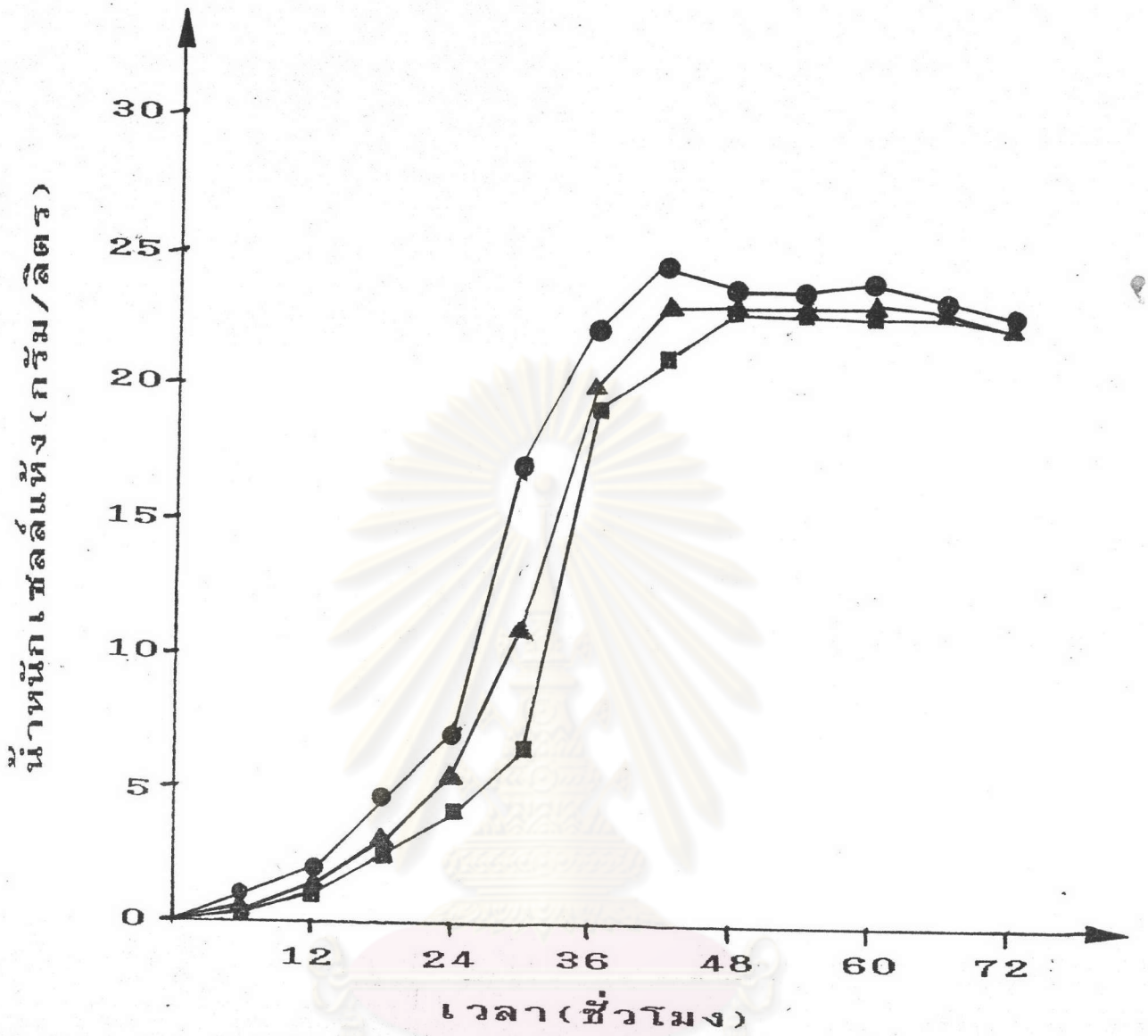
รูปที่ 9 ผลของลักษณะการเขย่าแบบวงกลม(●)และแบบเส้นตรง(▲)ด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที ต่อการเติบโตของ Candida oeophila C-73 ในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ

3.3 ผลของความเร็วรอบในการเขย่า

เลี้ยงยีสต์Candida oleophila C-73 ในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ(สูตรอาหารในภาคผนวกที่ 1.6) ตามวิธีการทดลองในข้อ 2.6.1.3 เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 °ซ. เขย่าให้อากาศแบบวงกลมโดยแปรผันความเร็วรอบในการเขย่าเป็น 200 250 และ 300 รอบต่อนาที ติดตามการเติบโตของเชื้อทุกๆ 6 ชั่วโมง ตามวิธีการทดลองในข้อ 2.3.1 พบว่า ความเร็วรอบในการเขย่ามีผลต่อการเติบโตของ Candida oleophila C-73 ดังแสดงในรูปที่ 10 การเติบโตของเชื้อจะดีที่สุดเมื่อเขย่าให้อากาศด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที ดังนั้นการเตรียมหัวเชื้อ Candida oleophila C-73 ในการวิจัยขั้นต่อไปจะเลี้ยงเชื้อด้วยการเขย่าให้อากาศแบบวงกลมด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที

3.4 ผลของอุณหภูมิ

เลี้ยงเชื้อ Candida oleophila C-73 ในอาหารสำหรับการเตรียมหัวเชื้อ (สูตรอาหารในภาคผนวกที่ 1.6) ตามวิธีการทดลองในข้อที่ 2.6.1.4 เลี้ยงเชื้อโดยการเขย่าให้อากาศแบบวงกลมด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที แปรผันอุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อเป็น 25°ซ. 30°ซ. และ35°ซ. ติดตามการเติบโตของเชื้อทุก 6 ชั่วโมง ตามวิธีการทดลองในข้อ 2.3.1 จากผลการทดลองในรูปที่ 11 แสดงให้เห็นว่า อุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อมีผลต่อการเติบโตของ Candida oleophila C-73 เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นการเติบโตจะลดลง ซึ่งเชื้อ Candida oleophila C-73 จะเติบโตมากที่สุดเมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25°ซ. และเชื้อจะเข้าสู่ระยะคงที่ (stationary phase) หลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 42 ชั่วโมง โดยมีน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 22.9 กรัมต่อลิตร ดังนั้นในการเลี้ยง Candida oleophila C-73 เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อสำหรับการผลิตกรดมะนาวจะเลี้ยงโดยการเขย่าให้อากาศที่ 25° ซ. เป็นเวลานาน 36 ชั่วโมงก่อนการถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลวเพื่อผลิตกรดมะนาวต่อไป

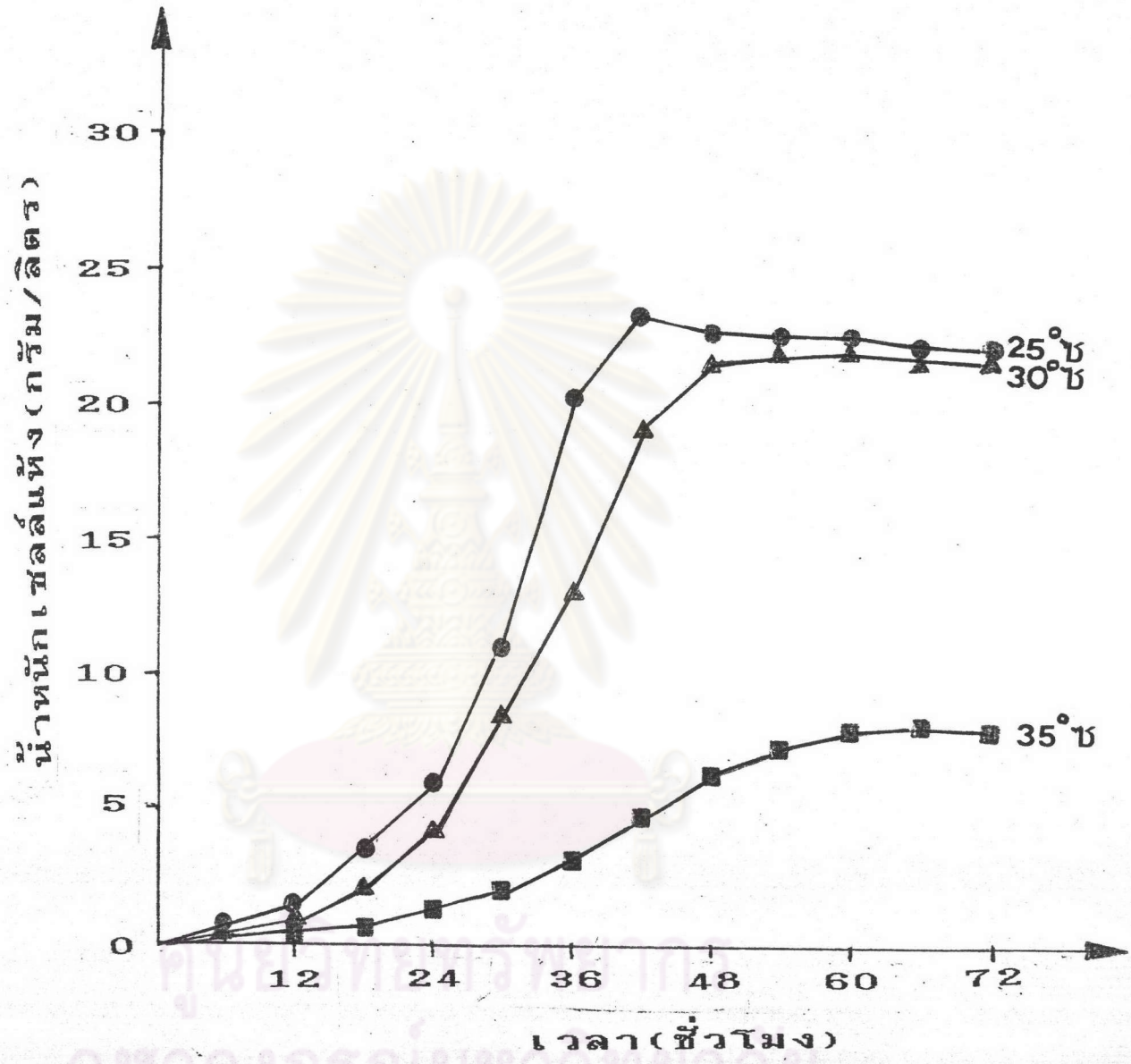


รูปที่ 10 ผลของความเร็วรอบในการเขย่าต่อการเติบโตของ Candida oleophila C-73 ในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ

■ = ความเร็ว 200 รอบต่อนาที

▲ = ความเร็ว 250 รอบต่อนาที

● = ความเร็ว 300 รอบต่อนาที

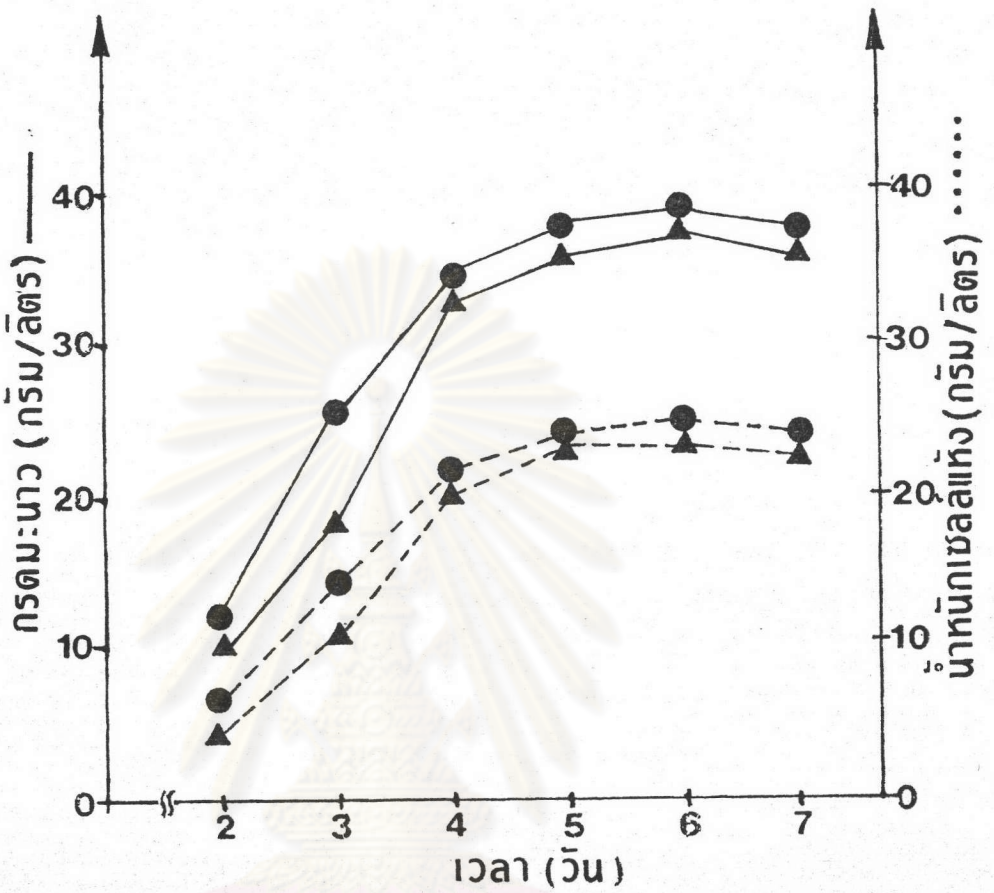


รูปที่ 11 ผลของอุณหภูมิต่อการเติบโตของ Candida oleophia C-73 ในอาหารสำหรับการเตรียมหัวเชื้อ

4.การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อ Candida oleophila C-73

4.1 ผลของลักษณะการเขย่า

จากการศึกษาผลของลักษณะการเขย่าต่อการเติบโตของCandida oleophila C-73 ในอาหารเหลวสำหรับหัวเชื้อ พบว่าการเขย่าแบบวงกลมเหมาะสมกว่าการเขย่าแบบเส้นตรง(ผลการทดลองในข้อ 3.2) ดังนั้นจึงศึกษาผลของลักษณะการเขย่าต่อการผลิตกรดมะนาวด้วย โดยการเตรียมหัวเชื้อในอาหารเหลวสูตรตามภาคผนวกที่ 1.6 เลี้ยงเชื้อด้วยการเขย่าให้อากาศแบบวงกลมที่ความเร็วรอบ 300 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 25° ซ.เป็นเวลานาน 36 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลวสำหรับการผลิตกรดมะนาวตามวิธีการทดลองในข้อ 2.1.1 เลี้ยงเชื้อโดยการเขย่าให้อากาศแบบวงกลมเปรียบเทียบกับการเขย่าแบบเส้นตรงด้วยความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30° ซ. วิเคราะห์ปริมาณกรดมะนาวโดยวิธีเพนตาโบรโมอะซีโตนตามวิธีการทดลองในข้อ 2.3.2 ติดตามการเติบโตโดยการหาน้ำหนักเซลล์แห้งตามวิธีการทดลองในข้อ 2.3.1 พบว่าน้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้โดย Candida oleophila C-73จากการเขย่าให้อากาศแบบวงกลมหลังเลี้ยงเชื้อ 6 วัน มีค่าเท่ากับ 24.9 กรัมต่อลิตร และ 39.0 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งมากกว่าน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้โดยการเขย่าให้อากาศแบบเส้นตรงเพียงเล็กน้อยคือเท่ากับ 24.0 กรัมต่อลิตร และ37.5 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (ดังแสดงในรูปที่ 12) และการเลี้ยงเชื้อโดยการเขย่าแบบเส้นตรงจะมีแคลเซียมคาร์บอเนต และเซลล์ของยีสต์เกาะติดกับผนังข้างขวดทดลองมากกว่า ทำให้ปริมาณเซลล์ในอาหารลดลง ซึ่งอาจมีผลต่อการผลิตกรดมะนาวได้ ดังนั้นในการวิจัยขั้นต่อไปจะเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดมะนาวโดยการเขย่าให้อากาศแบบวงกลมด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30° ซ.



รูปที่ 12 ผลของลักษณะการเขย่าแบบวงกลม และการเขย่าแบบเส้นตรงที่ความเร็วรอบ 250 รอบ/นาที ต่อการเติบโตและการผลิตกรดมะนาวของเชื้อ Candida oleophila C-73

● = การเขย่าแบบวงกลม

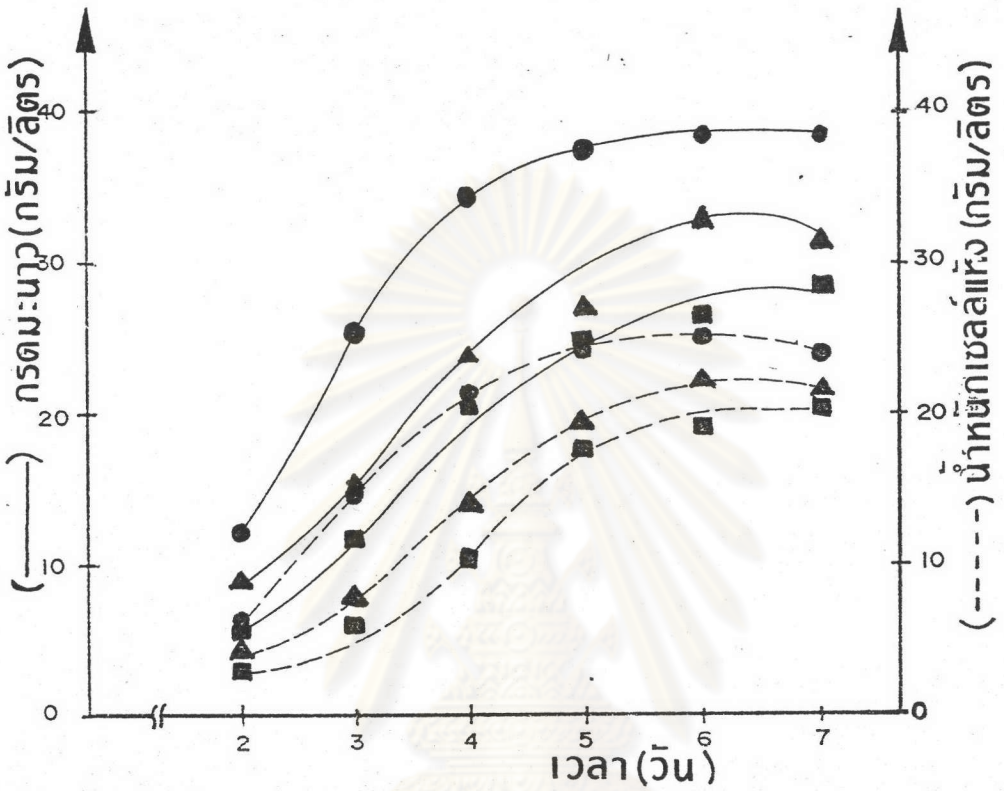
▲ = การเขย่าแบบเส้นตรง

4.2 ผลของปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

จากการที่นอร์มัลพาราฟฟินส์เป็นสารที่ไม่ละลายในน้ำ และมีความถ่วงจำเพาะน้อยกว่าน้ำ(ประมาณ 0.80) เมื่อนำมาใช้เตรียมเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วทำให้สารแหล่งคาร์บอน คือ นอร์มัลพาราฟฟินส์ลอยตัวอยู่เฉพาะบนผิวเท่านั้น มีผลทำให้เชื้อที่อยู่ในชั้นของน้ำสัมผัสกับสารแหล่งคาร์บอนได้น้อยลงกว่าการใช้สารแหล่งคาร์บอนชนิดอื่น ดังนั้นจึงทำการศึกษาผลของปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตกรดมะนาว โดยการเลี้ยง Candida oleophila C-73 เช่นเดียวกับวิธีในข้อ 4.1 แปรผันปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมในขวดทดลองขนาด 250 มล. เป็น 12.5 มล. 25.0 มล. และ 50.0 มล. วิเคราะห์หาปริมาณกรดมะนาวโดยวิธีเพนตาโบรโมอะซีโตน น้ำหนักเซลล์แห้ง ตามวิธีการทดลองในข้อ 2.3.1 และ2.3.2 ตามลำดับ พบว่าปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลต่อการเติบโตและการผลิตกรดมะนาวโดย Candida oleophila C-73 ดังแสดงในรูปที่ 13 น้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 12.5 มล. จะมากที่สุดคือเท่ากับ 24.9 กรัมต่อลิตร และ 39.0 กรัมต่อลิตร ตามลำดับภายหลังเลี้ยงเชื้อนาน 6 วัน และเมื่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มขึ้น การเติบโต และการผลิตกรดมะนาวจะลดลง ดังนั้นในการทดลองต่อไปจะใช้อาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 12.5 มล.ในขั้นการเตรียมหัวเชื้อ และขั้นการหมักเพื่อผลิตกรดมะนาวต่อไป

4.3 ผลของอุณหภูมิ

จากการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเติบโตของเชื้อ Candida oleophila C-73 ในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ(การทดลองที่ 3.4) วิเคราะห์หาปริมาณกรดมะนาว น้ำหนักเซลล์แห้ง ตามวิธีการทดลองในข้อ 2.3.1 และ 2.3.2 ตามลำดับ พบว่าที่อุณหภูมิ 25° ซ. เหมาะสมกับการเติบโต ดังนั้นในการทดลองนี้จะศึกษาถึงผลของอุณหภูมิต่อการผลิตกรดมะนาวโดยการเลี้ยง Candida oleophila C-73 เช่นเดียวกับวิธีในข้อ 4.2 แปรผันอุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อเป็น 25° ซ. 30° ซ. และ 35° ซ. ผลการทดลอง (รูปที่ 14)แสดงให้เห็นว่าอุณหภูมิมีผลทั้งต่อการเติบโตและการผลิตกรดมะนาว ที่อุณหภูมิ 25 ° ซ. เหมาะสมที่สุดสำหรับการเติบโต และการผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อ Candida oleophila C-73โดยมีน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณกรดมะนาวเท่ากับ 25.6 กรัมต่อลิตร และ 40.5 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นการเติบโตและการผลิตกรดมะนาวจะ

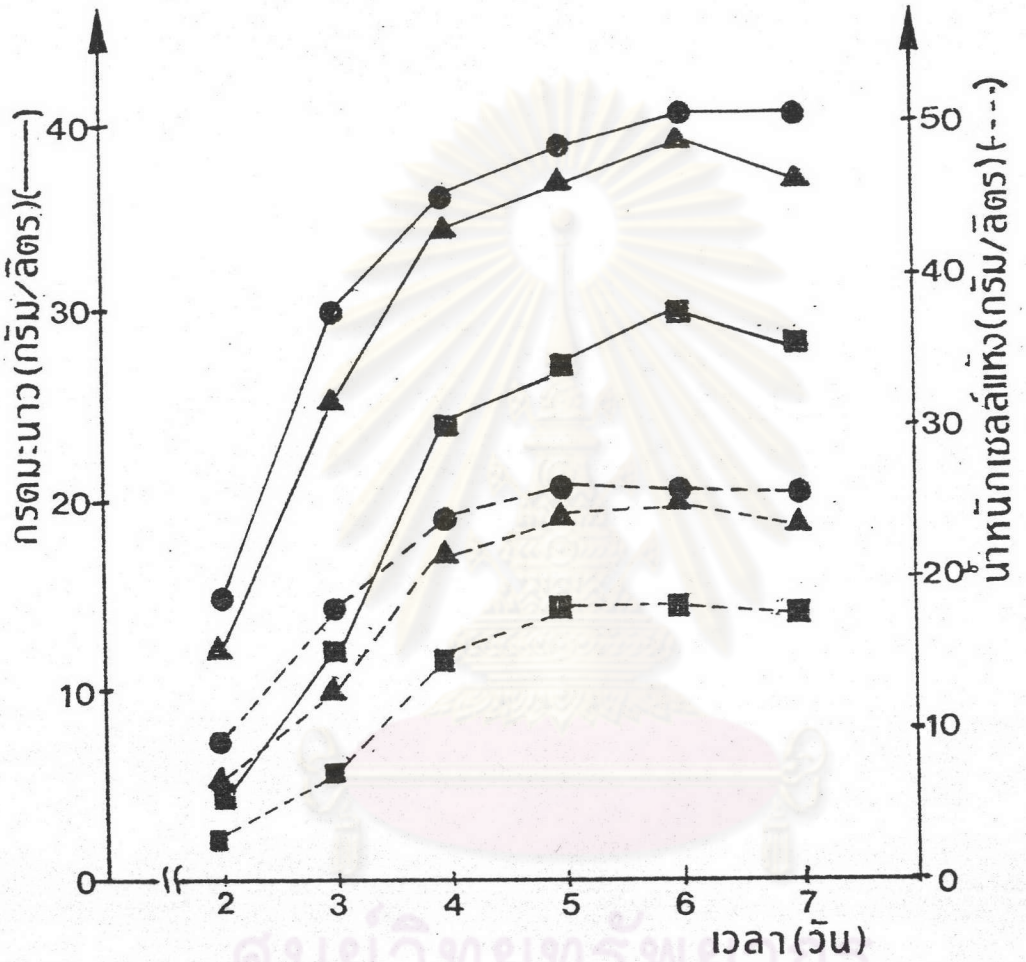


รูปที่ 13 ผลของปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการเติบโตและการผลิตกรดมะนาวของ Candida oleophila C-73 ในขวดทดลองขนาด 250 มล.

● = ปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ 12.5 มล.

▲ = ปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ 25.0 มล.

■ = ปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ 50.0 มล.



รูปที่ 14 ผลของอุณหภูมิต่อการเติบโตและการผลิตกรดมะนาวของ Candida oleophila C-73

● = อุณหภูมิ 25 ° ซ.

▲ = อุณหภูมิ 30 ° ซ.

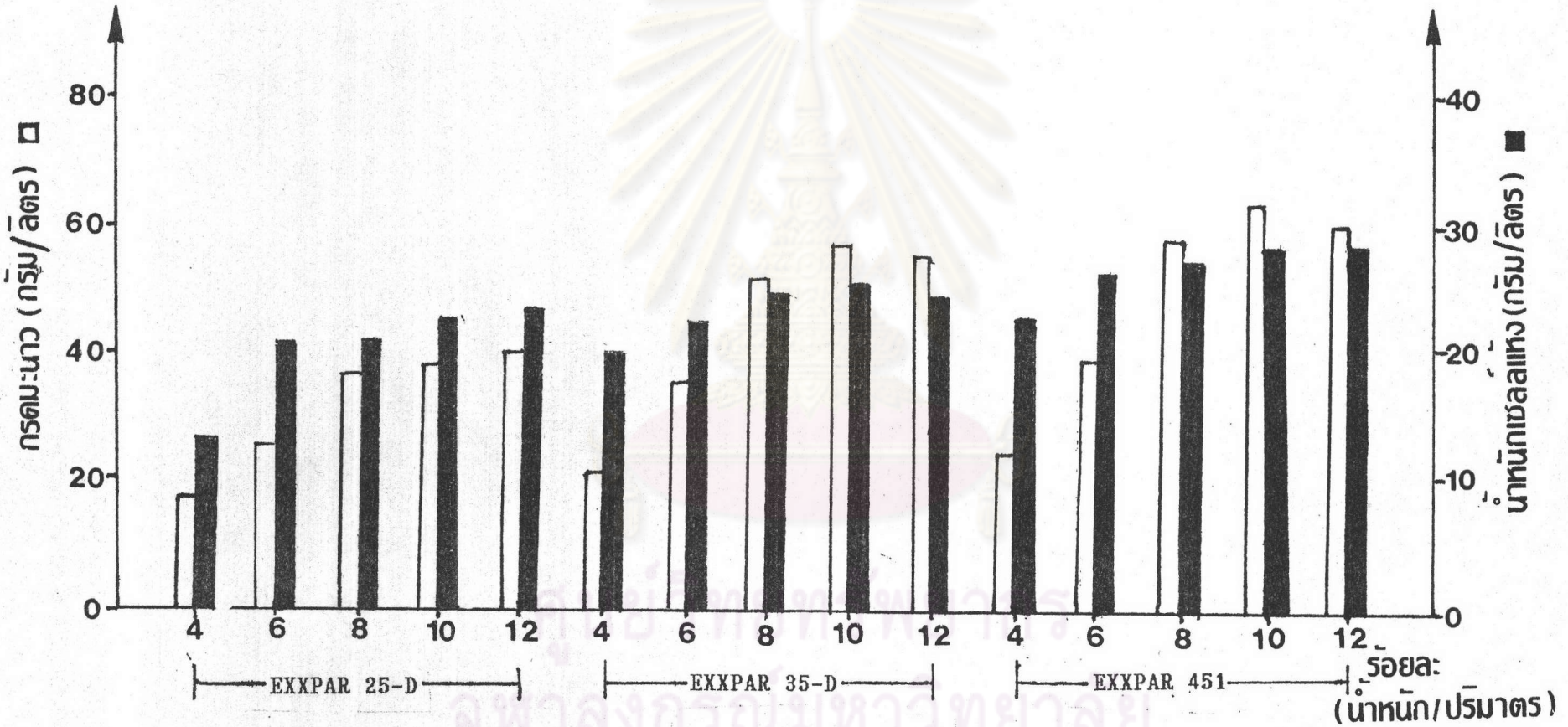
■ = อุณหภูมิ 35 ° ซ.

ลดลง โดยเฉพาะที่อุณหภูมิ 35° ซ. ปริมาณกรดมะนาวจะลดลงจากที่ 25° ซ.ประมาณร้อยละ 25.9 ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงเลือกอุณหภูมิ 25 ° ซ.สำหรับการผลิตกรดมะนาว

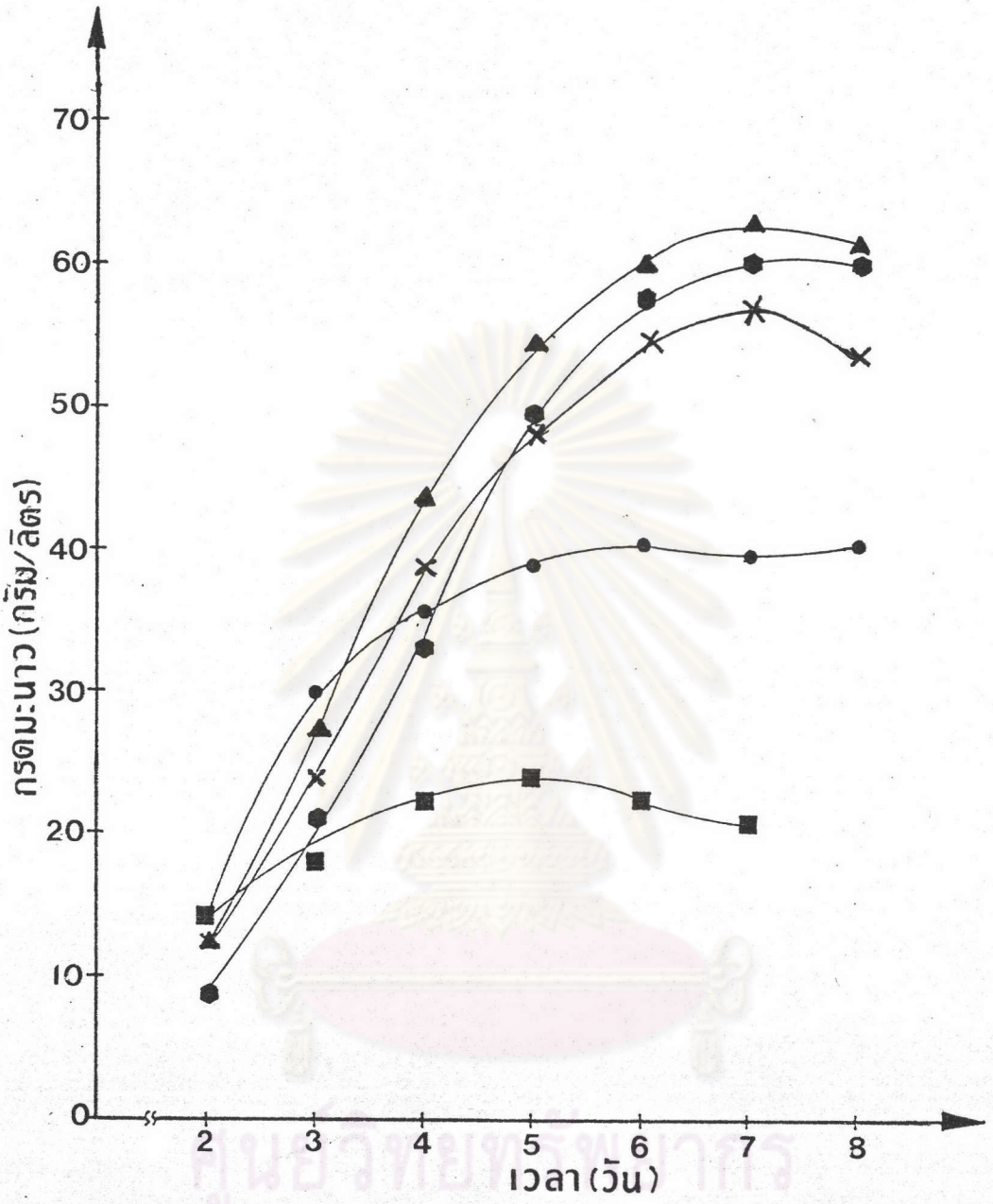
5. การศึกษาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม สำหรับการผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อ Candida oleophila C-73

5.1 ผลของชนิดและความเข้มข้นของนอร์มัล พาราฟฟินส์

นอร์มัล พาราฟฟินส์ที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการวิจัย ได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัท Exxon Chemicals จำกัดมีอยู่ 3 ชนิดด้วยกันคือ EXXPAR 25-D EXXPAR 35-D และ EXXPAR 451 ซึ่งมีองค์ประกอบดังแสดงในภาคผนวกที่ 10 ในการทดลองนี้จะศึกษาถึงชนิดและปริมาณของนอร์มัล พาราฟฟินส์ที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดมะนาวโดยจะเลี้ยงเชื้อ Candida oleophila C-73 เช่นเดียวกับวิธีในข้อ 4.3 โดยแปรผันชนิดและปริมาณของนอร์มัล พาราฟฟินส์ทั้ง 3 ชนิดเป็นร้อยละ 4 6 8 10 และ 12 (น้ำหนักต่อปริมาตร) วิเคราะห์หาน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดมะนาว และปริมาณนอร์มัลพาราฟฟินส์ที่เหลืออยู่ในน้ำหมัก ตามวิธีการทดลองในข้อ 2.3.1 2.3.2 และ 2.3.5 ตามลำดับ ผลการทดลอง พบว่านอร์มัล พาราฟฟินส์ชนิด EXXPAR 451 ที่ความเข้มข้นร้อยละ 10 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ให้ปริมาณกรดมะนาวสูงสุดคือ 63.0 กรัมต่อลิตร หลังการเลี้ยงเชื้อนาน 7 วัน ซึ่งมากกว่าปริมาณกรดมะนาวสูงสุดที่ผลิตได้จากนอร์มัล พาราฟฟินส์ชนิด EXXPAR 25-D (ความเข้มข้นร้อยละ 12) อยู่ร้อยละ 35.7 และ ร้อยละ 9.5 เมื่อเทียบกับปริมาณกรดมะนาวสูงสุดที่ผลิตได้จาก EXXPAR 35-D ที่ความเข้มข้นร้อยละ 10(รูปที่ 15) เมื่อพิจารณาปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีนอร์มัลพาราฟฟินส์ชนิด EXXPAR 451 ที่ความเข้มข้นต่างๆ (รูปที่ 16) พบว่านอร์มัล พาราฟฟินส์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 10 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นปริมาณที่เหมาะสมที่สุดที่จะใช้ในการทดลองขั้นต่อไป เนื่องจากเป็นช่วงความเข้มข้นที่ให้ร้อยละของผลผลิตสูงสุดคือ 77.0 และมีน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 28.0 กรัมต่อลิตร (ดังแสดงใน ตารางที่ 11)



รูปที่ 15 ผลของชนิดและความเข้มข้นของนอร์มัล พาราฟฟินส์ต่อการเติบโตและการผลิตกรดมะนาวโดย Candida oleophila C-73



รูปที่ 16 ผลของความเข้มข้นของนอร์มัล พาราฟฟินส์ชนิด EXXPAR 451 ต่อการผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อ Candida oleophila C-73

■ = ความเข้มข้นร้อยละ 4 (น้ำหนัก/ปริมาตร)

● = ความเข้มข้นร้อยละ 6 (น้ำหนัก/ปริมาตร)

X = ความเข้มข้นร้อยละ 8 (น้ำหนัก/ปริมาตร)

▲ = ความเข้มข้นร้อยละ 10 (น้ำหนัก/ปริมาตร)

⬢ = ความเข้มข้นร้อยละ 12 (น้ำหนัก/ปริมาตร)

ตารางที่ 11 ผลของนอร์มัล พาราฟฟินส์ชนิด EXXPAR 451 ต่อการเติบโตและการผลิตกรดมะนาวโดย Candida oleophila C-73

นอร์มัล พาราฟฟินส์ (กรัม/ลิตร)		เวลา* (วัน)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	ปริมาณกรดมะนาว (กรัม/ลิตร)	ผลผลิต** (ร้อยละ)
เริ่มต้น	สุดท้าย				
40	0	5	22.7	24.0	60.0
60	0	6	25.8	39.0	65.0
80	0.5	7	27.4	57.0	71.6
100	18.2	7	28.0	63.0	77.0
120	37.9	7	28.2	60.0	73.0

หมายเหตุ

เครื่องหมาย * หมายถึง ระยะเวลา(วัน)ของการหมักที่ให้ผลผลิตสูงสุด

** หมายถึง ร้อยละของผลผลิตกรดมะนาวโดยคิดจากปริมาณของนอร์มัลพาราฟฟินส์ที่ถูกใช้ไป หรือเขียนเป็นสมการได้เป็น

$$\text{ผลผลิตกรดมะนาว (ร้อยละ)} = \frac{\text{กรดมะนาวที่ผลิตได้(กรัม/ลิตร)}}{\text{นอร์มัลพาราฟฟินส์ที่ถูกใช้ไป(กรัม/ลิตร)}} \times 100$$ โดยที่

$$\text{นอร์มัลพาราฟฟินส์ที่ถูกใช้ไป (กรัม/ลิตร)} = \text{นอร์มัลพาราฟฟินส์เริ่มต้น (กรัม/ลิตร)} - \text{นอร์มัลพาราฟฟินส์ที่เหลือ (กรัม/ลิตร)}$$

5.2 ผลของแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ

จากผลการทดลองในข้อที่ 5.1พบว่าปริมาณของนอร์มัลพาราฟฟินส์ชนิดEXXPAR 451 ที่ความเข้มข้นร้อยละ 10 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เหมาะสมที่สุดต่อการผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อ Candida oleophila C-73 ดังนั้นในการทดลองนี้จะเปรียบเทียบการผลิตกรดมะนาวโดยใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อตามสูตรอาหารในภาคผนวกที่ 1.8 ซึ่งจะใช้สารแหล่งคาร์บอนปริมาณต่างๆ ดังต่อไปนี้

1. กลูโคสความเข้มข้นร้อยละ 10 (น้ำหนักต่อปริมาตร)
2. มอลโตสความเข้มข้นร้อยละ 5 (น้ำหนักต่อปริมาตร)
3. กาแลคโตสความเข้มข้นร้อยละ 10 (น้ำหนักต่อปริมาตร)
4. ฟรุคโตสความเข้มข้นร้อยละ 10 (น้ำหนักต่อปริมาตร)
5. แลคโตสความเข้มข้นร้อยละ 5 (น้ำหนักต่อปริมาตร)
6. ซูโครส ความเข้มข้นร้อยละ 5 (น้ำหนักต่อปริมาตร)
7. แป้งที่ย่อยแล้วความเข้มข้นร้อยละ 26.5(ปริมาตรต่อปริมาตร)
8. แป้งละลายน้ำความเข้มข้นร้อยละ 10(น้ำหนักต่อปริมาตร)
9. กลีเซอรอลความเข้มข้นร้อยละ 10 (น้ำหนักต่อปริมาตร)
10. น้ำมันถั่วเหลือง ความเข้มข้นร้อยละ 10(น้ำหนักต่อปริมาตร)
11. นอร์มัล พาราฟฟินส์ความเข้มข้นร้อยละ 10(น้ำหนักต่อปริมาตร)

สารแหล่งคาร์บอนชนิดที่ 1 - 7 ปริมาณที่ใช้ในการเตรียมอาหารจะใช้เทียบจากปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ร้อยละ 10 ที่มีอยู่ในสารนั้นๆ (แป้งที่ย่อยแล้ว แสดงในภาคผนวกที่ 4) โดยที่น้ำตาลโมเลกุลคู่ ได้แก่ ซูโครส จะคิดหลังการไฮโดรไลส์ด้วยกรดได้เป็นน้ำตาลรีดิวซ์ก่อน ส่วนสารแหล่งคาร์บอนชนิดที่ 8-11 จะใช้การชั่งน้ำหนักสารนั้นโดยตรง

เลี้ยงเชื้อ Candida oleophila C-73 ในอาหารดังกล่าวข้างต้นในสภาวะเช่นเดียวกับข้อ 5.1 วิเคราะห์หาน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดมะนาว และน้ำตาลรีดิวซ์ตามวิธีการทดลองในข้อ 2.3.1.2 2.3.2 และ2.3.3 ตามลำดับ ผลการทดลอง(ตารางที่ 12) พบว่า Candida oleophila C-73 ไม่สามารถใช้มอลโตส ซูโครส แลคโตส หรือแป้งที่ละลายน้ำ จึงไม่พบการเติบโต และการผลิตกรดมะนาว ส่วนปริมาณกรดมะนาวสูงสุด คือ 63.0 กรัมต่อลิตรได้จากการใช้นอร์มัล พาราฟฟินส์ความเข้มข้น 100 กรัมต่อ

ลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน รองลงมา คือ การใช้สารแหล่งคาร์บอนจำพวกน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว ได้แก่ กลูโคส แป้งที่ย่อยแล้ว(ประกอบด้วยกลูโคส เป็นองค์ประกอบหลัก) และฟรุคโตส เป็นต้น โดยให้ผลผลิตกรดมะนาวเท่ากับ 41.5 39.0 และ 37.5 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และเมื่อพิจารณาน้ำตาลรีดิวซ์ในน้ำหมัก พบว่าถูกใช้ไปจนหมดภายหลังการเลี้ยงเชื้อนาน 3 วัน ดังนั้นในการทดลองต่อไปจะศึกษาถึงผลของปริมาณกลูโคส หรือแป้งที่ย่อยแล้วที่เพิ่มขึ้นจากความเข้มข้นเดิม(ร้อยละ 10) ต่อการผลิตกรดมะนาวของเชื้อ Candida oleophila C-73 เนื่องจาก สารแหล่งคาร์บอนทั้งสองมีราคาถูกกว่าน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวชนิดอื่น(ฟรุคโตส และ กาแลคโตส)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 12 ผลของแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆต่อการเติบโต และการผลิตกรดมะนาวของ *Candida oleophila* C-73

สารแหล่งคาร์บอน	เวลา* (วัน)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	กรดมะนาว (กรัม/ลิตร)
กลูโคส	3	19.7	41.5
มอลโตส	0	0	0
กาแลคโตส	3	18.9	35.5
แลคโตส	0	0	0
ฟรุคโตส	3	19.8	37.5
ซูโครส	0	0	0
แป้งที่ย่อยแล้ว	3	17.5	39.0
แป้งละลายน้ำ	0	0	0
กลีเซอรอล	6	24.6	34.5
น้ำมันถั่วเหลือง	7	25.6	28.5
นอร์มัลพาราฟฟินส์	7	27.5	63.0

หมายเหตุ * หมายถึง ระยะเวลา(วัน)ของการหมักที่ให้ผลผลิตสูงที่สุด

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5.3 ผลของปริมาณกลูโคส หรือแป้งที่ย่อยแล้ว

เลี้ยงเชื้อ Candida oleophila C-73ในอาหารเลี้ยงเชื้อ และสภาวะการการเลี้ยงเชื้อเช่นเดียวกันกับวิธีในข้อ 5.2 แปรผันความเข้มข้นของกลูโคส หรือความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ในแป้งที่ย่อยแล้วเท่ากับร้อยละ 10 15 20 และ25 (น้ำหนักต่อปริมาตร) วิเคราะห์หาน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดมะนาว ปริมาณน้ำตาลที่เหลืออยู่ในน้ำหมัก ตามวิธีการทดลองในข้อ 2.3.1.2 2.3.2 และ 2.3.3 ตามลำดับ ผลการทดลอง(ตารางที่ 13) พบว่า เมื่อเพิ่มปริมาณของสารแหล่งคาร์บอน คือ กลูโคส (รูปที่ 17) หรือ แป้งที่ย่อยแล้ว (รูปที่ 18) การเติบโตและการผลิตกรดมะนาวจะเพิ่มขึ้น โดยปริมาณกรดมะนาวสูงสุดเมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนได้เท่ากับ 105.0 กรัมต่อลิตร หรือคิดเป็นผลผลิตได้เท่ากับร้อยละ 54.7 ภายหลังการเลี้ยงเชื้อนาน 5 วันซึ่งเมื่อปริมาณของน้ำตาลกลูโคสเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 25 ปริมาณกรดมะนาว(105 กรัมต่อลิตร)หรือผลผลิต (ร้อยละ 54.1)ที่ได้กลับคงที่ หรือลดลงเล็กน้อย และใช้เวลานานกว่าคือ 6 วัน ส่วนปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้โดยใช้แป้งที่ย่อยแล้วที่มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ความเข้มข้น ร้อยละ 25 (111.0 กรัมต่อลิตร) มีค่ามากกว่าปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้(105.0 กรัมต่อลิตร) จากแป้งที่ย่อยแล้วที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ร้อยละ 20 แต่เมื่อคิดเป็นร้อยละของผลผลิตกรดมะนาวผลที่ได้กลับตรงข้ามกัน คือที่ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ร้อยละ 20 จะให้ผลผลิตร้อยละ 52.5 ซึ่งสูงกว่าที่ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ร้อยละ 25 (ร้อยละ 48.6) แสดงให้เห็นว่าการเพิ่มขึ้นของปริมาณกรดมะนาวที่ได้ไม่คุ้มค่าต่อการเพิ่มปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ แต่อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้นอร์มัลพาราฟฟินส์เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าทั้งกลูโคส และ แป้งที่ย่อยแล้วให้ร้อยละของผลผลิตกรดมะนาวต่ำกว่า การใช้นอร์มัลพาราฟฟินส์(ผลผลิตร้อยละ 77.0)

ตารางที่ 13 ผลของปริมาณกลูโคส หรือแป้งที่ย่อยแล้วต่อการเติบโต และการผลิตกรดมะนาวของ Candida oleophila C-73

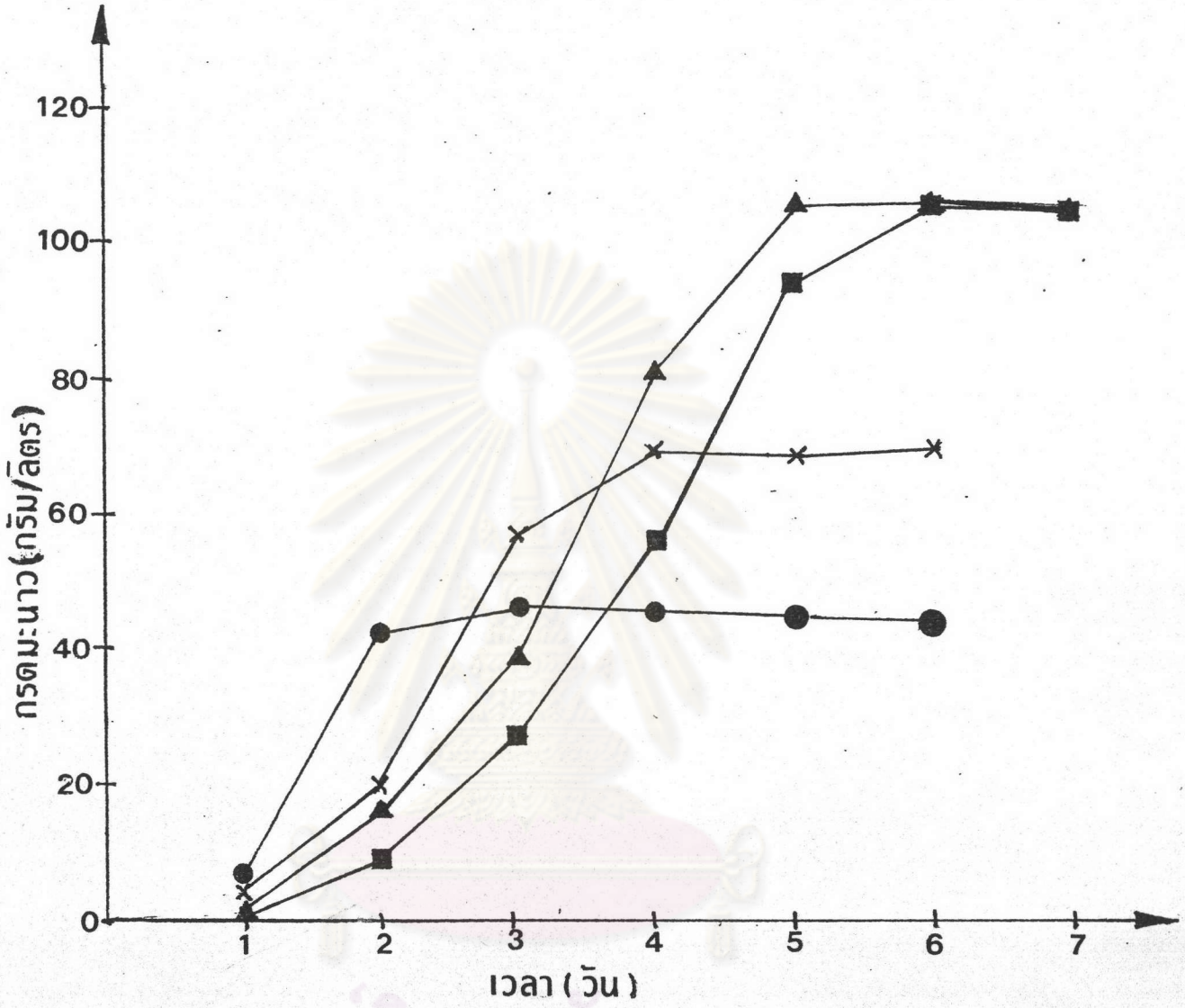
แหล่งคาร์บอน	ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน (กรัม/ลิตร)		เวลา* (วัน)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	กรดมะนาว (กรัม/ลิตร)	ผลผลิต** (ร้อยละ)
	เริ่มต้น	สุดท้าย				
นอร์มัล-พาราฟฟินส์	100.0	18.2	7	28.0	63.0	77.0
กลูโคส	100.0	0	3	19.7	41.5	41.5
	150.0	0	4	24.6	69.0	46.0
	200.0	8.2	5	27.3	105.0	54.7
	250.0	56.0	6	32.7	105.0	54.1
แป้งที่ย่อยแล้ว	100.0	0	3	17.5	39.0	39.0
	150.0	0	4	25.6	64.5	43.0
	200.0	0	4	27.9	105.0	52.5
	250.0	21.6	6	30.0	111.0	48.6

หมายเหตุ * หมายถึง ระยะเวลา(วัน)ของการหมักที่ให้ผลผลิตสูงสุด

** หมายถึง ร้อยละของผลผลิตกรดมะนาวโดยคิดจากปริมาณสารแหล่งคาร์บอนที่ถูกใช้ไป หรือเขียนเป็นสมการได้เป็น

$$\text{ผลผลิตกรดมะนาว (ร้อยละ)} = \frac{\text{กรดมะนาวที่ผลิตได้(กรัม/ลิตร)}}{\text{สารแหล่งคาร์บอนที่เหลือ(กรัม/ลิตร)}} \times 100$$

โดยที่ สารแหล่งคาร์บอนที่เหลือ (กรัม/ลิตร) = สารแหล่งคาร์บอนเริ่มต้น (กรัม/ลิตร) - สารแหล่งคาร์บอนสุดท้าย (กรัม/ลิตร)



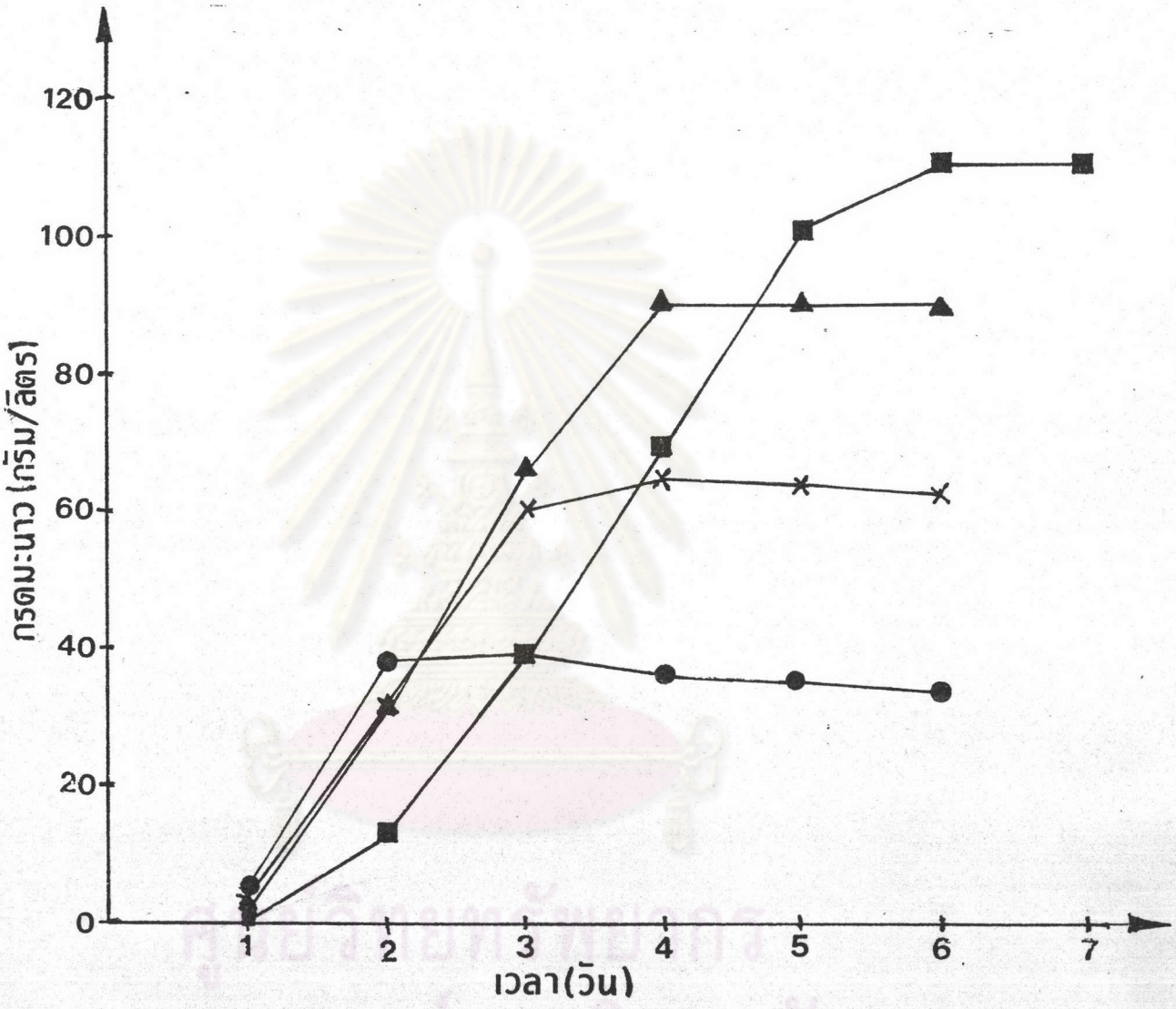
รูปที่ 17 ผลของความเข้มข้นของกลูโคสต่อการผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อ Candida oleophila C-73

● = กลูโคสความเข้มข้นร้อยละ 10 (น้ำหนักต่อปริมาตร)

× = กลูโคสความเข้มข้นร้อยละ 15 (น้ำหนักต่อปริมาตร)

▲ = กลูโคสความเข้มข้นร้อยละ 20 (น้ำหนักต่อปริมาตร)

■ = กลูโคสความเข้มข้นร้อยละ 25 (น้ำหนักต่อปริมาตร)



รูปที่ 18 ผลของความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ในแป้งที่ย่อยแล้วต่อการผลิตกรดมะนาว โดยเชื้อ Candida oleophila C-73

● = แป้งที่ย่อยแล้วที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ร้อยละ 10 (น้ำหนักต่อปริมาตร)

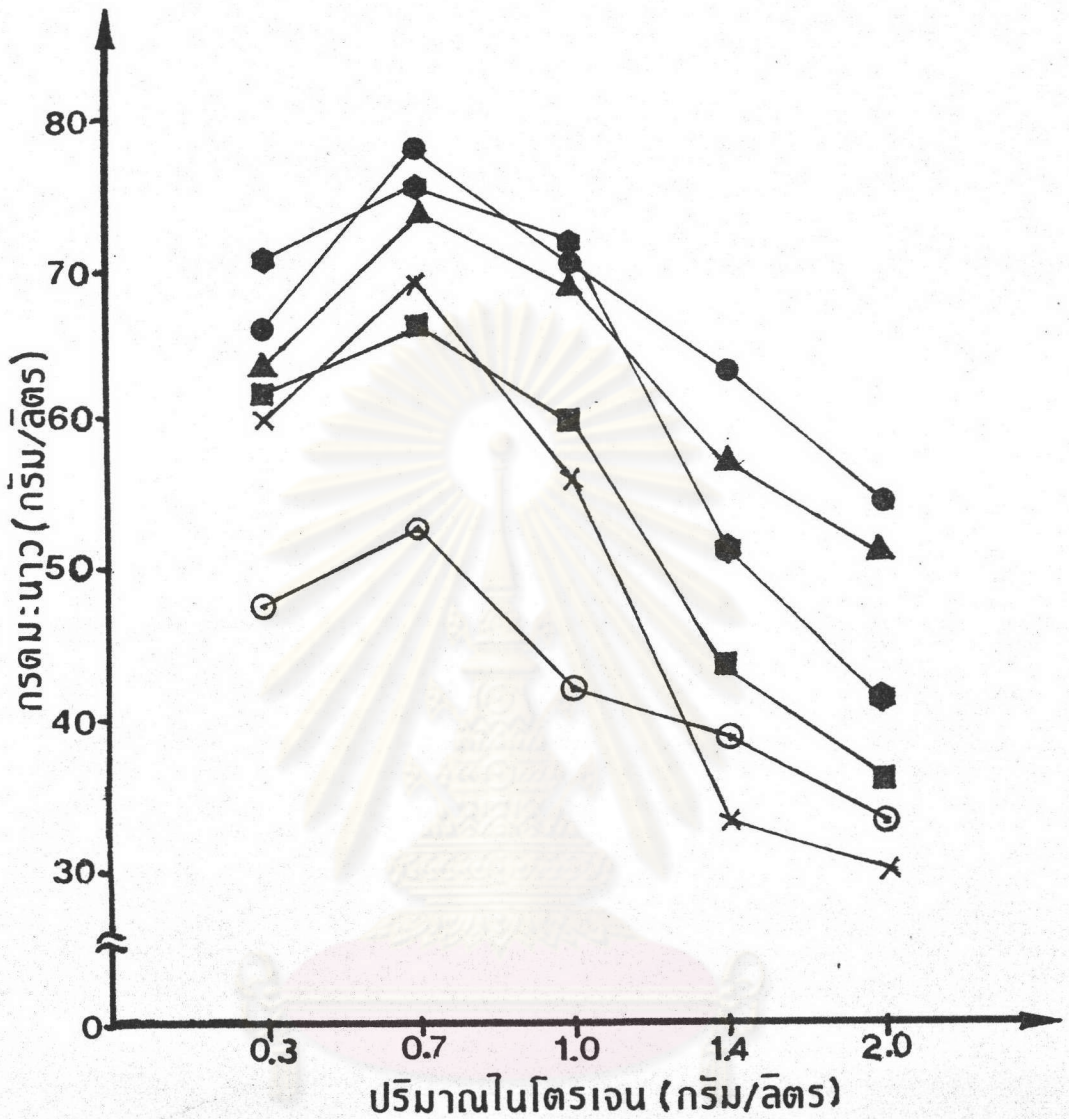
× = แป้งที่ย่อยแล้วที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ร้อยละ 15 (น้ำหนักต่อปริมาตร)

▲ = แป้งที่ย่อยแล้วที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ร้อยละ 20 (น้ำหนักต่อปริมาตร)

■ = แป้งที่ย่อยแล้วที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ร้อยละ 25 (น้ำหนักต่อปริมาตร)

5.3 ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน

จากข้อมูลต่างๆที่รวบรวมโดย Christian P.kubicek และMax Rohr[1] พบว่าแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดมะนาว คือ สารแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจน ได้แก่ แอมโมเนียมไนเตรต แอมโมเนียมคลอไรด์ เป็นต้นดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงเลือกใช้สารแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจนชนิดต่างๆ ได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมคลอไรด์ แอมโมเนียมไนเตรต และสารแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนบางชนิด ได้แก่ คอร์นสตีปลิเคอร์ สารสกัดจากยีสต์ และสารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากถั่วเหลืองที่สกัดไขมันแล้ว โดยเลี้ยง Candida oleophila C-73 ในสูตรอาหารตามภาคผนวกที่ 1.9 ซึ่งประกอบด้วย นอร์มัล พาราฟฟินส์ความเข้มข้นร้อยละ 10 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน แปรผันความเข้มข้นแหล่งไนโตรเจนในรูปของธาตุไนโตรเจนตั้งแต่ร้อยละ 0.03 0.07 0.10 0.14 และ 0.17 (น้ำหนักต่อปริมาตร) สภาวะอื่นในการเลี้ยงเชื้อเช่นเดียวกับข้อ 5.2 วิเคราะห์หาน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดมะนาว และปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด ตามวิธีการทดลองในข้อ 2.3.1.2 2.3.2 และ 2.3.4 ผลการทดลอง(รูปที่ 19) พบว่า Candida oleophila C-73 สามารถผลิตกรดมะนาวในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี สารแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจน ได้สูงกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน โดยปริมาณกรดมะนาวสูงสุดคือ 78.0 กรัมต่อลิตร ผลิตได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี แอมโมเนียมไนเตรต (มีไนโตรเจนร้อยละ 0.07) เป็นแหล่งไนโตรเจน และเมื่อความเข้มข้นของแอมโมเนียมไนเตรตเพิ่มขึ้นมากกว่าร้อยละ 0.2 (มีไนโตรเจนร้อยละ 0.07) พบว่าการเติบโตของเชื้อ Candida oleophila C-73 จะสูงขึ้น แต่การผลิตกรดมะนาวจะลดลง(ตารางที่ 14) นอกจากนี้แล้ว ยังพบว่าเชื้อ Candida oleophila C-73 ไม่สามารถใช้โซเดียมไนเตรตเป็นสารแหล่งไนโตรเจนได้ จึงไม่พบทั้งการเติบโตและการผลิตกรดมะนาว ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไปจะใช้แอมโมเนียมไนเตรตความเข้มข้นร้อยละ 0.2 กรัมต่อลิตรเป็นสารแหล่งไนโตรเจน



รูปที่ 19 ผลของชนิดและปริมาณของสารแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตกรดมะนาวของเชื้อ Candida oleophila C-73

- ● = แอมโมเนียมไนเตรต
- ▲ = แอมโมเนียมซัลเฟต
- ⬢ = แอมโมเนียมคลอไรด์
- ○ = คอร์นสตรีปลิเคอร์
- × = สารสกัดจากยีสต์
- ■ = สารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากถั่วเหลืองที่สกัดไขมันแล้ว

ตารางที่ 14 ผลของแอมโมเนียมไนเตรตต่อการเติบโตและการผลิตกรดมะนาวของ *Candida oleophila* C-73

แอมโมเนียมไนเตรต (ร้อยละ)	เวลา* (วัน)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	กรดมะนาว (กรัม/ลิตร)
0.1	6	19.6	66.0
0.2	6	22.7	78.0
0.3	7	25.3	70.5
0.4(ชุดควบคุม)	7	27.1	63.0
0.5	7	29.3	54.5

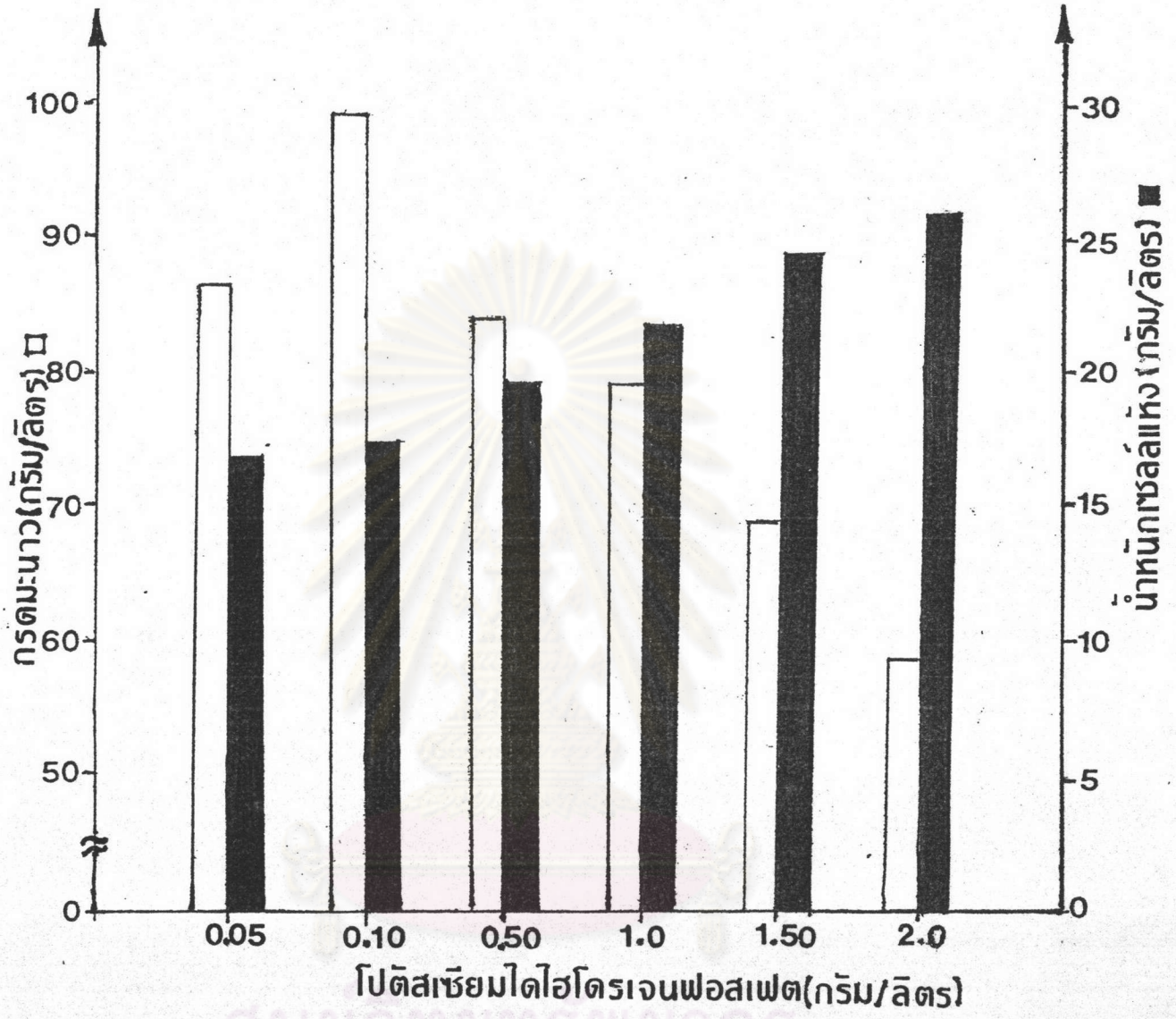
หมายเหตุ * หมายถึง ระยะเวลา(วัน)ของการหมักที่ให้ผลผลิตกรดมะนาวสูงสุด

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5.4 ผลของโปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต

จากรายงานเกี่ยวกับการผลิตกรดมะนาวโดยใช้ยีสต์สายพันธุ์ต่างๆนั้น มักใช้โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตเป็นแหล่งของฟอสฟอรัส ซึ่งเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของกรดนิวคลีอิก(nucleic acid) นิวคลีโอไทด์ชนิดต่างๆ และฟอสฟอไลปิด เป็นต้น ดังนั้น ในการศึกษานี้จะศึกษาผลของปริมาณโปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตต่อการเติบโตและการผลิตกรดมะนาว เลี้ยงเชื้อ Candida oleophila C-73 ในอาหารเลี้ยงเชื้อตามสูตรในภาคผนวกที่ 1.10 แปรผันความเข้มข้นของโปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตเท่ากับร้อยละ 0.005 0.01 0.05 0.10 0.15 และ 0.20 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เลี้ยงเชื้อในสภาวะเช่นเดียวกับข้อ 5.3 วิเคราะห์หาน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดมะนาว ตามวิธีการทดลองในข้อ 2.3.1 และ 2.3.2 ตามลำดับ จากผลการทดลอง(รูปที่ 20) พบว่าความเข้มข้นเริ่มต้นของโปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตมีผลต่อการผลิตกรดมะนาวของเชื้อ Candida oleophila C-73 ปริมาณกรดมะนาวสูงสุดเท่ากับ 99.0 กรัมต่อลิตรภายหลังการเลี้ยงเชื้อนาน 6 วัน ผลิตได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีโปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ความเข้มข้นร้อยละ 0.01(น้ำหนักต่อปริมาตร) นอกจากนี้ยังพบว่า เมื่อความเข้มข้นของโปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตเพิ่มขึ้น ค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อไม่แตกต่างกัน(เท่ากับ 8.11) ส่วนการเติบโตจะเพิ่มมากขึ้นโดยมีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด (26.2 กรัมต่อลิตร) ที่ความเข้มข้นของโปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตร้อยละ 0.2 (น้ำหนักต่อปริมาตร)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 20 ผลของโปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตต่อการเติบโตและการผลิตกรดมะนาวของเชื้อ Candida oleophila C-73

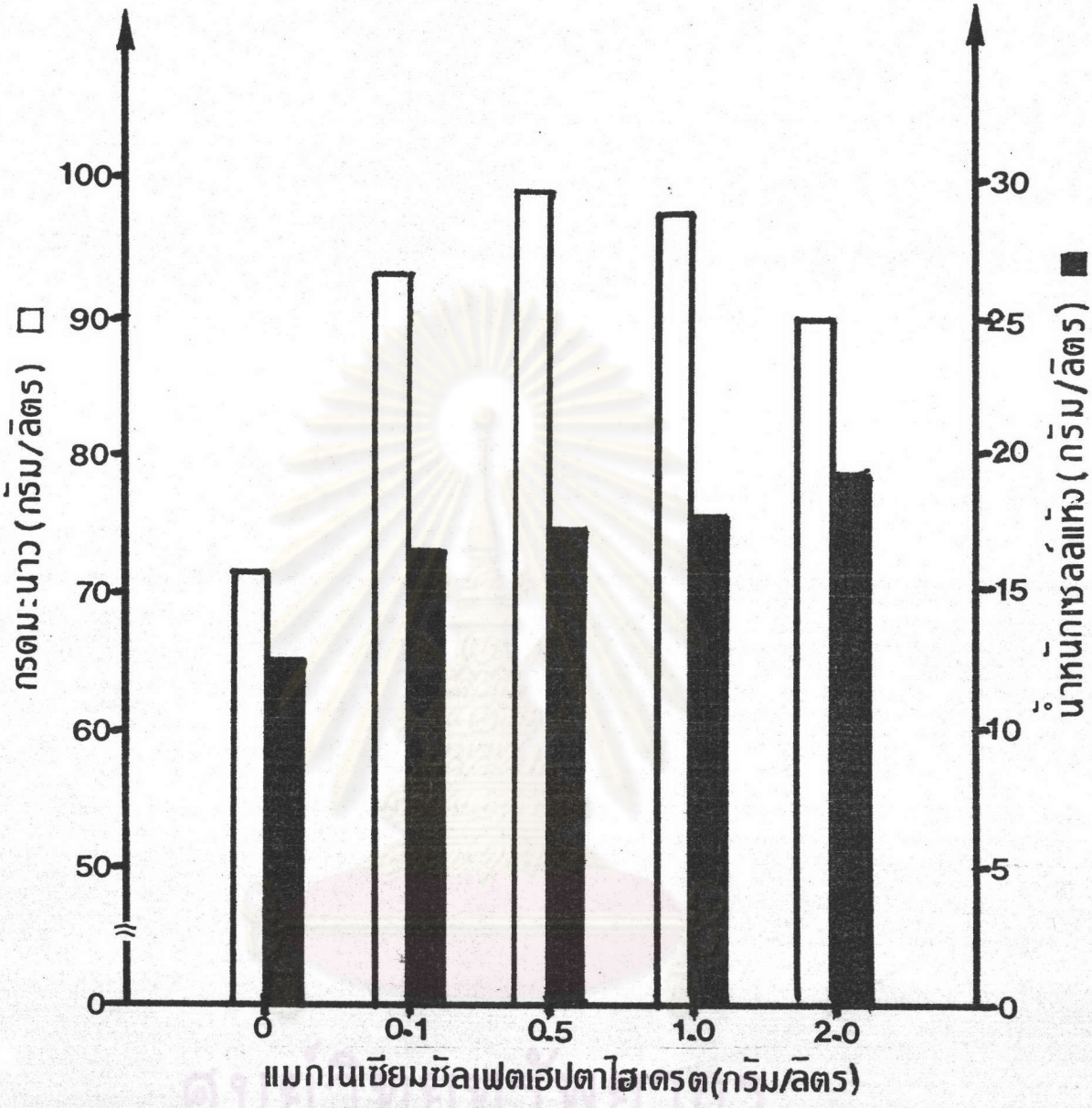
5.5 ผลของแมกเนเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต

แมกเนเซียมเป็นธาตุที่เป็นองค์ประกอบที่สำคัญในเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์ โดยเป็นโคแฟคเตอร์ของเอ็นไซม์หลายชนิด ที่สำคัญคือ เอ็นไซม์จำพวกไคเนส(kinases)อยู่ที่ผนังเซลล์วอลล์(cell wall) และเซลล์เมมเบรน(cell membrane) แต่ปริมาณที่เหมาะสมขึ้นอยู่กับชนิดของสายพันธุ์จุลินทรีย์ ดังนั้นในการทดลองนี้จะศึกษาเพื่อหาปริมาณที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดมะนาวของเชื้อ Candida oleophila C-73 โดยแปรผันความเข้มข้นของแมกเนเซียมซัลเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อตั้งแต่ร้อยละ 0 - 0.1 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ตามสูตรอาหารในภาคผนวกที่ 1.11 และเลี้ยงเชื้อในสภาวะเช่นเดียวกับข้อ 5.4 วิเคราะห์หาน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดมะนาว ตามวิธีการทดลองในข้อ 2.3.1 และ 2.3.1 ผลการทดลอง(รูปที่ 21)พบว่า เชื้อ Candida oleophila C-73 ผลิตกรดมะนาวได้สูงสุดเท่ากับ 99.0 กรัมต่อลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแมกเนเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรตความเข้มข้นร้อยละ 0.05(น้ำหนักต่อปริมาตร) โดยใช้ระยะเวลาการหมักนาน 6 วัน เมื่อความเข้มข้นของแมกเนเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรตเพิ่มขึ้นการเติบโตจะเพิ่มมากขึ้น แต่การผลิตกรดมะนาวจะลดลง ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไปจะใช้แมกเนเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรตความเข้มข้นร้อยละ 0.05 (น้ำหนักต่อปริมาตร)ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการผลิตกรดมะนาวต่อไป

5.6 ผลของชนิดและปริมาณของอิออนโลหะหนัก

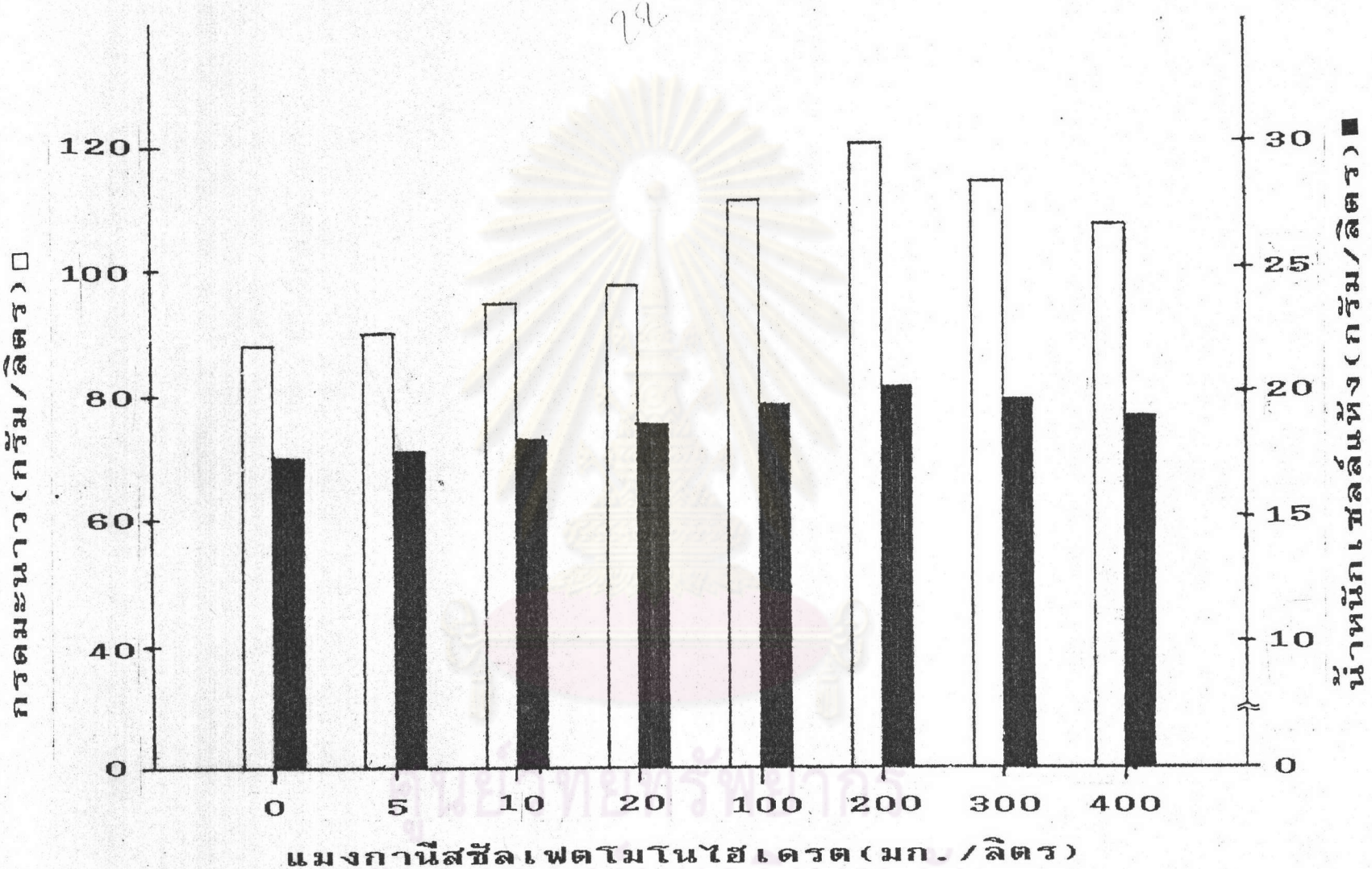
5.6.1 ผลของชนิดและปริมาณของอิออนโลหะหนักแต่ละชนิด

การผลิตกรดมะนาวจากสารจำพวกคาร์โบไฮเดรต โดยเชื้อรา A. niger พบว่าอิออนของโลหะหนักสี่ชนิด คือ Fe^{2+} Mn^{2+} Zn^{2+} และ Cu^{2+} มีผลต่อการผลิตกรดมะนาวอย่างมาก ดังนั้นจึงทำการศึกษาผลของอิออนของโลหะทั้งสี่ชนิดในรูปของเกลือซัลเฟต คือเฟอร์รัสซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต แมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรต ซิงค์ซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต และคอปเปอร์ซัลเฟตเพนตาไฮเดรต โดยแปรผันความเข้มข้นของเกลือซัลเฟตของ Fe^{2+} Mn^{2+} หรือ Zn^{2+} ตั้งแต่ร้อยละ 0 - 0.04 มิลลิกรัมต่อลิตร และแปรผันความเข้มข้นของเกลือซัลเฟตของ Cu^{2+} ตั้งแต่ร้อยละ 0- 0.0025 ทีละชนิด ในสูตรอาหารตามภาคผนวกที่ 1.12 เลี้ยงเชื้อ Candida oleophila C-73

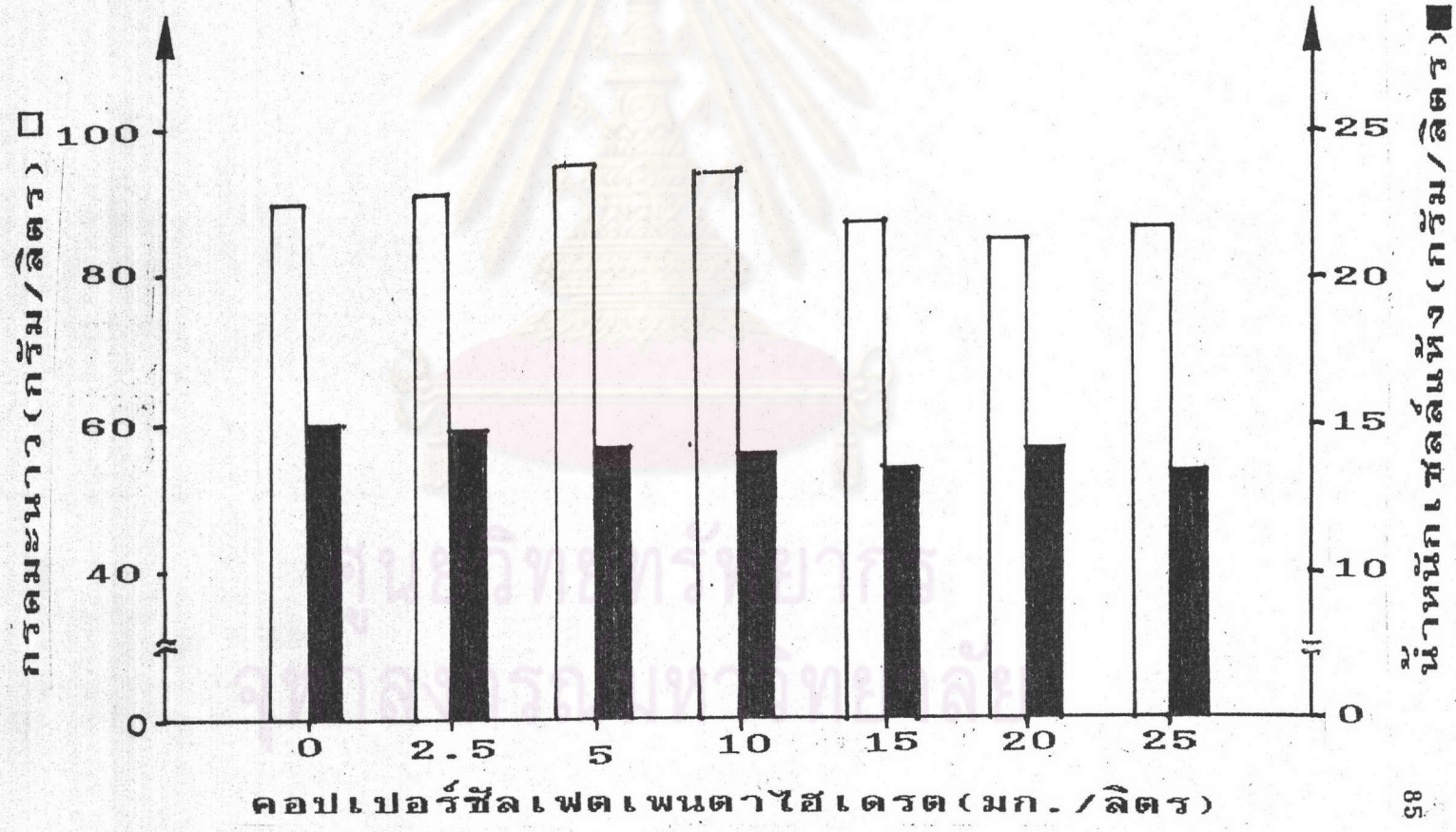


รูปที่ 21 ผลของแมกเนเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรตต่อการเติบโตและการผลิตกรดมะนาวของเชื้อ Candida oleophila C-73

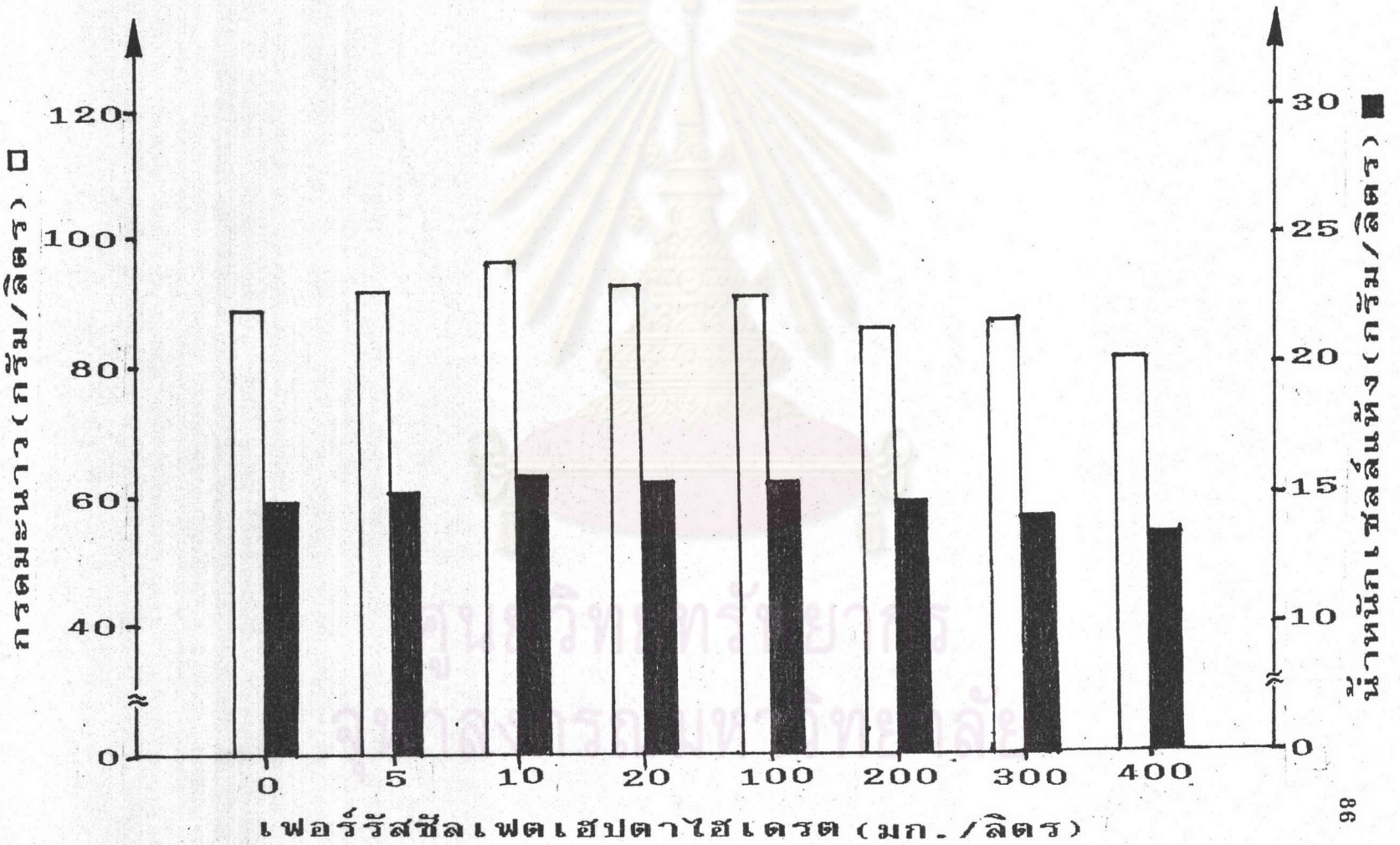
ตามสภาวะเช่นเดียวกันกับข้อ 5.5 วิเคราะห์หาน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดมะนาว ตามวิธีการทดลองในข้อ 2.3.1 และ 2.3.2 ตามลำดับ พบว่าเมื่อไม่มีการเติมเกลือซัลเฟตของโลหะชนิดใดๆ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ การเติบโตและการผลิตกรดมะนาวของเชื้อ Candida oleophila C-73 จะลดลงเหลือ 90.0 กรัมต่อลิตร(ชุดควบคุมเท่ากับ 99.0 กรัมต่อลิตร)ภายหลังการเลี้ยงเชื้อนาน 6 วัน แต่เมื่อมีการเติมเกลือซัลเฟตของโลหะลงในอาหารเลี้ยงเชื้อทีละชนิด พบว่าเมื่อเติมแมงกานีสซัลเฟตเฮปตาไฮเดรตลงในอาหารเลี้ยงเชื้อความเข้มข้นร้อยละ 0.02(น้ำหนักต่อปริมาตร) Candida oleophila C-73 จะให้ผลผลิตกรดมะนาวสูงสุด คือ 120.0 กรัมต่อลิตรโดยมีน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 17.9 กรัมต่อลิตร หลังการเลี้ยงเชื้อนาน 6 วัน แต่เมื่อปริมาณของแมงกานีสซัลเฟตเฮปตาไฮเดรตเพิ่มขึ้นมากกว่าร้อยละ 0.02(น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาณกรดมะนาวและการเติบโตจะลดลง(รูปที่ 22) เมื่อพิจารณาผลของเกลือซัลเฟตของโลหะอีก 3 ชนิด พบว่า มีผลต่อการเติบโตและการผลิตกรดมะนาวน้อยกว่าเมื่อเติมเกลือซัลเฟตของแมงกานีส ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมคอปเปอร์ซัลเฟตเพนตาไฮเดรตพบว่าการผลิตกรดมะนาวของเชื้อCandida oleophila C-73 จะเพิ่มขึ้นเล็กน้อยเมื่อเทียบกับชุดควบคุม คือมีปริมาณสูงสุด 96.0 กรัมต่อลิตร เมื่อเติมคอปเปอร์ซัลเฟตความเข้มข้นร้อยละ $5x10^{-4}$(น้ำหนักต่อปริมาตร) แต่การเติบโตของเชื้อจะลดลง เมื่อมีการเติมคอปเปอร์ซัลเฟตเพนตาไฮเดรตลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ(รูปที่ 23) ส่วนความเข้มข้นที่เหมาะสมของเฟอร์รัสซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต คือ ร้อยละ $1^{*}10^{-3}$ (น้ำหนักต่อปริมาตร) โดยให้ผลผลิตกรดมะนาวเท่ากับ 96.0 กรัมต่อลิตร แต่เมื่อปริมาณของเฟอร์รัสซัลเฟตเฮปตาไฮเดรตเพิ่มขึ้นมากกว่านี้ พบว่า การผลิตกรดมะนาว และการเติบโตจะลดลง และเมื่อความเข้มข้นเพิ่มมากขึ้นจนถึงร้อยละ 0.04 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาณกรดมะนาวจะลดลงเหลือเท่ากับ 80.5 กรัมต่อลิตร หรือลดลงคิดเป็นร้อยละ 16.1(รูปที่ 24) เมื่อพิจารณาผลของซิงค์ซัลเฟตเฮปตาไฮเดรตต่อการผลิตกรดมะนาว(รูปที่ 25) พบว่า มีผลต่อการผลิตกรดมะนาวและการเติบโตของเชื้อ Candida oleophila C-73 น้อยกว่าผลของแมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรต โดยที่ความเข้มข้นที่เหมาะสมเท่ากับร้อยละ 0.02(น้ำหนักต่อปริมาตร) จะให้ผลผลิตกรดมะนาวเท่ากับ 99.0 กรัมต่อลิตร เมื่อเพิ่มความเข้มข้นขึ้น ผลผลิตกรดมะนาวกลับลดลง ดังนั้น



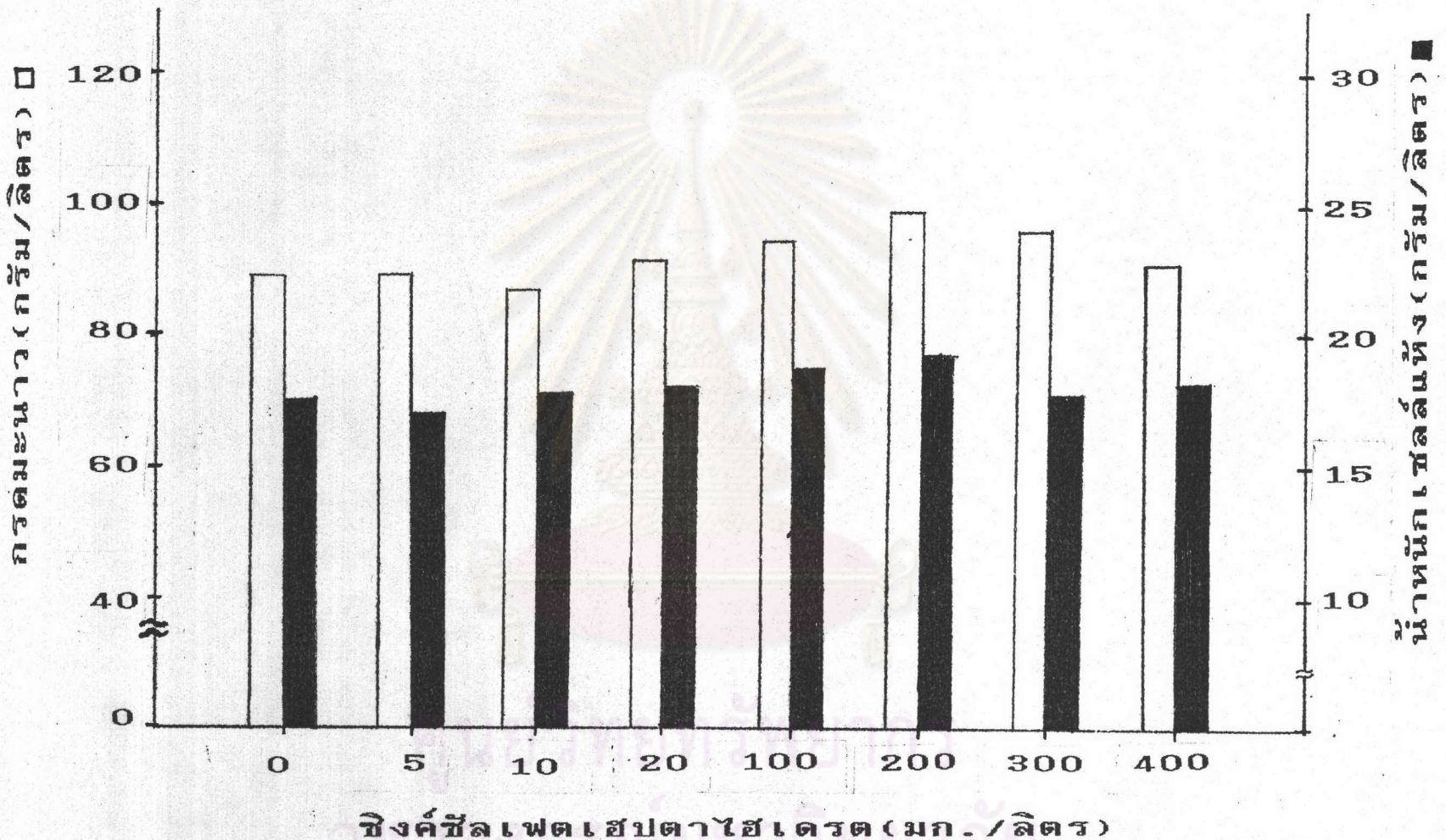
รูปที่ 22 ผลของแมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรตต่อการเติบโตและการผลิตกรดมะนาวโดย Candida oleophila C-73



รูปที่ 23 ผลของคอปเปอร์ซัลเฟตเพนตาไฮเดรตต่อการเติบโตและการผลิตกรดมะนาว โดย Candida oleophila C-73



รูปที่ 24 ผลของเฟอร์รัสซัลเฟตเฮปตาไฮเดรตต่อการเติบโตและการผลิตกรดมะนาว โดย Candida oleophila C-73



รูปที่ 25 ผลของชิงค์ซัลเฟตเฮปตาไฮเดรตต่อการเติบโตและการผลิตกรดมะนาวโดย

Candida oleophila C-73

ในการทดลองขั้นต่อไปจะศึกษาถึงผลของแร่ธาตุรวมที่ความเข้มข้นที่เหมาะสมนี้ต่อการเติบโ และการผลิตกรดมะนาวโดย Candida oleophila C-73

5.6.2 ผลของอิออนผสม

จากการศึกษาผลของอิออนโลหะหนักแต่ละชนิดดังแสดงในการทดลองในข้อ 5.6.1 พบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของโลหะต่างๆทั้ง 4 ชนิดเป็นดังต่อไปนี้ คือ แมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรตร้อยละ 0.02 เฟอร์รัสซัลเฟตเฮปตาไฮเดรตร้อยละ $1x10^{-3}$ คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตาไฮเดรต $5x10^{-4}$ หรือซิงค์ซัลเฟตเฮปตาไฮเดรตร้อยละ 0.02 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ดังนั้นในการทดลองนี้จะทำการศึกษาผลของอิออนของโลหะทั้ง 4 ชนิดดังกล่าว เมื่อนำมาผสมกันแบบต่างๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อตามสูตรในภาคผนวกที่ 1.12 เลี้ยงเชื้อ Candida oleophila C-73 โดยใช้สภาวะเช่นเดียวกันกับข้อ 5.6.1 วิเคราะห์หาน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดมะนาวตามวิธีการทดลองในข้อ 2.3.1 และ 2.3.2 ผลการทดลอง(ตารางที่ 15)พบว่า ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมแมงกานีสซัลเฟตเฮปตาไฮเดรตเพียงชนิดเดียวจะให้ผลผลิตกรดมะนาวสูงสุดคือ 120 กรัมต่อลิตรหลังการเลี้ยงเชื้อนาน 6 วัน โดยมีน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 17.9 กรัมต่อลิตร และเมื่อพิจารณาผลของการเติมอิออนของโลหะหนักโดยการผสมกันในแบบต่างๆ พบว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมแมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรตผสมอยู่กับเกลือซัลเฟตของโลหะชนิดอื่น ปริมาณของกรดมะนาวที่ผลิตได้จะมากกว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีการเติมแมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรตเลย ได้แก่ เมื่อเติมเฟอร์รัสซัลเฟตเฮปตาไฮเดรตเพียงชนิดเดียวลงในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช้ความเข้มข้นร้อยละ $1x10^{-3}$ (น้ำหนักต่อปริมาตร) พบว่า Candida oleophila C-73 สามารถผลิตกรดมะนาวได้เพียง 96.0 กรัมต่อลิตร แต่เมื่อมีการเติมแมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรตที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.02 การผลิตกรดมะนาวจะเพิ่มขึ้นเป็น 114.0 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมคอปเปอร์ซัลเฟตเพนตาไฮเดรตเพียงชนิดเดียวที่ความเข้มข้นเท่ากับร้อยละ $5.0x10^{-4}$ พบว่า ปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้เท่ากับ 96.0 กรัมต่อลิตร แต่เมื่อเติมแมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรตความเข้มข้นร้อยละ 0.02 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อด้วย พบว่าปริมาณกรดมะนาวจะเพิ่มขึ้นเป็น 108.0 กรัมต่อลิตร เป็นต้น แต่ถึงอย่างไรก็ตาม การ

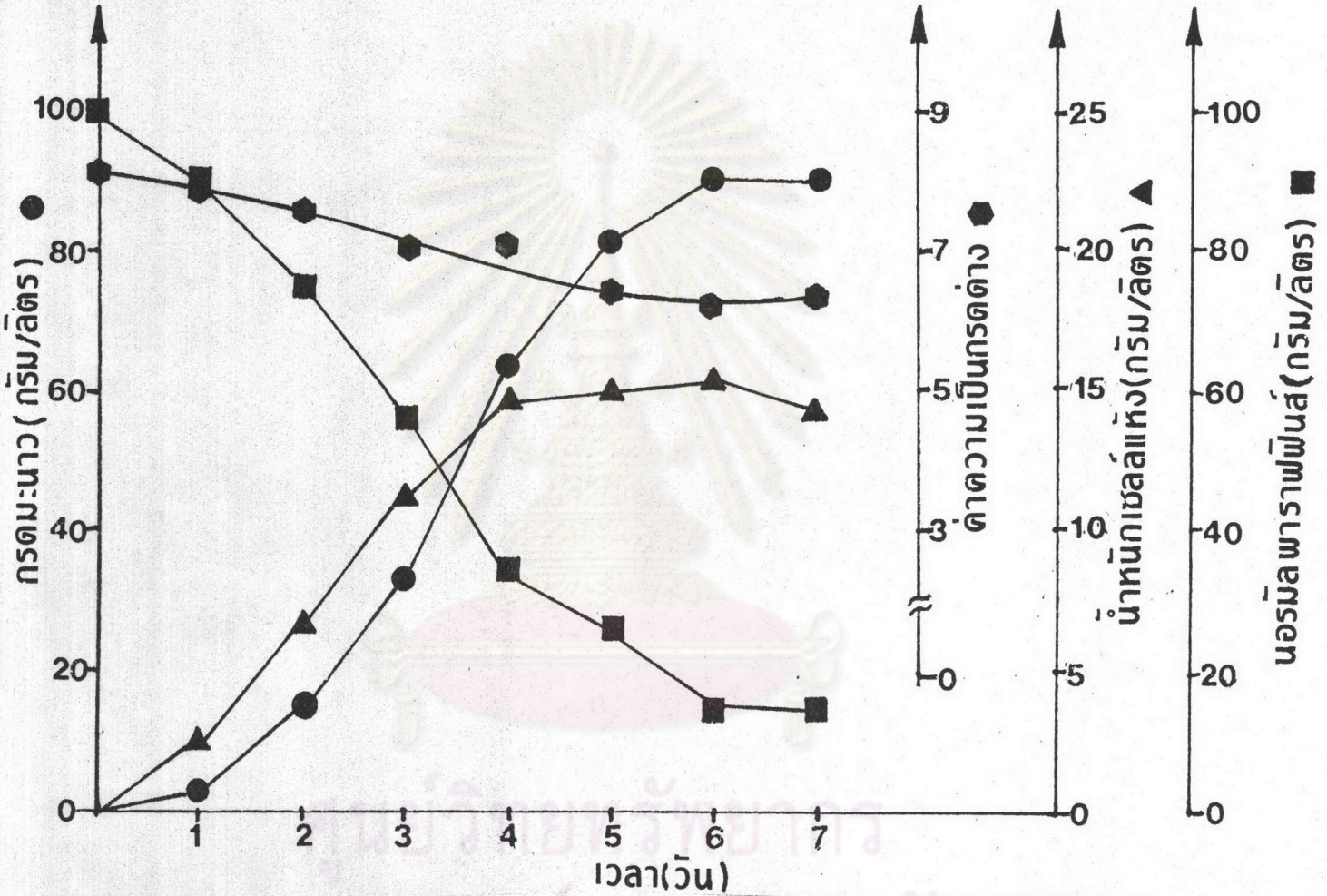
ผลิตกรดมะนาวของ Candida oleophila C-73 จะสูงสุดในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมแมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรตเพียงชนิดเดียวเท่านั้นโดยที่รูปแบบการเติบโต และการผลิตกรดมะนาวตลอดจนการใช้นอร์มัล พาราฟฟินส์ของ Candida oleophila C-73 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีการเติมแร่ธาตุชนิดใดๆ(รูปที่ 26) จะแตกต่างกับอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมแมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรตที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.02 (รูปที่ 27) ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไปจะใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่เติม แมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรตเพียงชนิดเดียวเท่านั้น

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

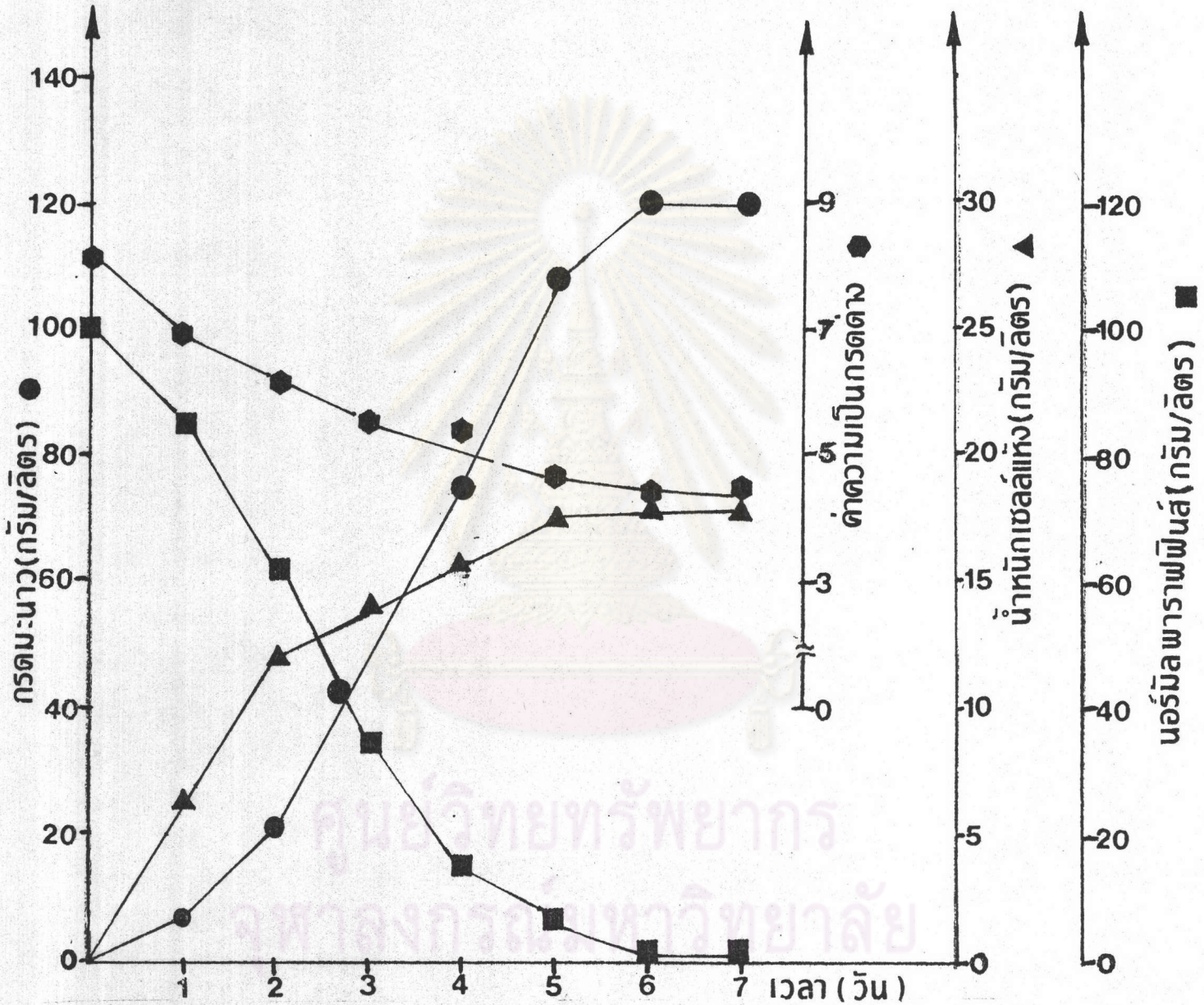
ตารางที่ 15 ผลของการเติมเกลือซัลเฟตของโลหะ 4 ชนิดในแบบต่างๆ กัน

การเติมเกลือซัลเฟตของโลหะ 4 ชนิด	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	กรดมะนาว (กรัม/ลิตร)
ชุดที่ไม่มีการเติมเกลือซัลเฟตของโลหะ	15.3	90.0
ชุดควบคุม*	17.2	99.0
$CuSO_4.5H_2O$	14.5	96.0
$FeSO_4.7H_2O$	16.1	96.0
$MnSO_4.H_2O$	17.9	120.0
$ZnSO_4.7H_2O$	17.5	99.0
$CuSO_4.5H_2O+FeSO_4.7H_2O$	16.8	105.0
$CuSO_4.5H_2O+MnSO_4.H_2O$	17.4	108.0
$CuSO_4.5H_2O+ZnSO_4.7H_2O$	17.0	96.0
$FeSO_4.7H_2O+MnSO_4.H_2O$	17.9	114.0
$FeSO_4.7H_2O+ZnSO_4.7H_2O$	16.4	96.0
$MnSO_4.H_2O+ZnSO_4.7H_2O$	16.5	105.0
$CuSO_4.5H_2O+FeSO_4.7H_2O+MnSO_4.H_2O$	17.2	103.5
$CuSO_4.5H_2O+FeSO_4.7H_2O+ZnSO_4.7H_2O$	17.0	99.0
$FeSO_4.7H_2O+MnSO_4.H_2O+ZnSO_4.7H_2O$	17.5	109.5
$CuSO_4.5H_2O+FeSO_4.7H_2O+MnSO_4.H_2O+ZnSO_4.7H_2O$	16.8	100.5

หมายเหตุ * หมายถึง อาหารเลี้ยงเชื้อที่เติม $CuSO_4.5H_2O$ 5.0 มก./ลิตร $FeSO_4.7H_2O$ 10.0 มก./ลิตร $MnSO_4.H_2O$ 10.0 มก./ลิตร และ $ZnSO_4.7H_2O$ 5.0 มก./ลิตร



รูปที่ 26 รูปแบบการเติบโตและการผลิตกรดมะนาวของ Candida oleophila C-73 เมื่อเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีการเติมแร่ธาตุชนิดใดๆ



รูปที่ 27 รูปแบบการเติบโตและการผลิตกรดมะนาวของ Candida oleophila C-73 เมื่อเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมแมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรตความเข้มข้น 200 กรัม/ลิตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5.7 ผลของสารช่วยเสริมการเติบโต(growth factors)

5.7.1 ผลของสารสกัดจากยีสต์ และไธอะมีนไฮโดรคลอไรด์

จากรายงานการศึกษาเกี่ยวกับองค์ประกอบของสารสกัดจากยีสต์ ซึ่งมักใช้เป็นแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน หรือเป็นสารช่วยเสริมการเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ เนื่องมาจากในสารสกัดจากยีสต์ประกอบไปด้วยวิตะมินชนิดต่างๆที่สำคัญ 8 ชนิดด้วยกัน[48] ได้แก่ ไธอะมีน ไรโบเฟลวิน (riboflavin) กรดนิโคตินิค (nicotinic acid) กรดแพนโตเธนิค(pantothenic acid) ไพริดอกซีน(pyridoxine) ไบโอติน(biotin) อินโนซิทอล (inosital) และโคลีน (choline) และจากรายงานการผลิตกรดมะนาวจากนอร์มัล พาราฟฟินส์โดยเชื้อยีสต์ พบว่าจะต้องมีการเติมวิตะมินบี 1 ในรูปของไธอะมีนไฮโดรคลอไรด์ หรือสารประกอบเชิงซ้อนที่มีวิตะมินหลายชนิดเป็นองค์ประกอบ หรืออาจจะใช้ในลักษณะที่ผสมกันไปขึ้นกับเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิต จากการทดลองที่ผ่านมาสูตรอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อประกอบด้วยสารสกัดจากยีสต์ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 และไธอะมีนไฮโดรคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.0001 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ดังนั้นในการทดลองนี้จะศึกษาถึงผลของการใช้ไธอะมีนไฮโดรคลอไรด์ หรือสารสกัดจากยีสต์เพียงอย่างใดอย่างหนึ่ง โดยใช้ความเข้มข้นของไธอะมีนไฮโดรคลอไรด์เท่ากับร้อยละ 0.0001 หรือสารสกัดจากยีสต์ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ตามสูตรอาหารในภาคผนวกที่ 1.13 เลี้ยงเชื้อ Candida oleophila C-73 โดยใช้สภาวะการเลี้ยงเชื้อเช่นเดียวกันกับข้อ 5.6 วิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดมะนาว ตามวิธีการทดลองในข้อ 2.3.1 และ 2.3.2 ตามลำดับ ผลการทดลอง(ตารางที่ 16) พบว่า ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีการเติมทั้งสารสกัดจากยีสต์ และไธอะมีนไฮโดรคลอไรด์ การผลิตกรดมะนาวและการเติบโตของเชื้อ Candida oleophila C-73 จะต่ำที่สุดคือเท่ากับ 54.0 กรัมต่อลิตร และน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 9.6 กรัมต่อลิตร และเมื่อเติมไธอะมีนไฮโดรคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.0001(น้ำหนักต่อปริมาตร)เพียงชนิดเดียว พบว่าการผลิตกรดมะนาว และน้ำหนักเซลล์แห้งจะเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยคือเท่ากับ 60.0 กรัมต่อลิตรและ9.8 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ แต่การผลิตกรดมะนาวและการเติบโตของเชื้อ Candida oleophila C-73 จะดีที่สุดในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมเฉพาะสารสกัดจากยีสต์ความเข้มข้นร้อยละ 0.1(น้ำหนัก

ต่อปริมาตร) ซึ่งเท่ากับชุดควบคุมที่เติมทั้งไธอะมีนไฮโดรคลอไรด์ และสารสกัดจากยีสต์ จากผลการทดลองดังกล่าวจะเห็นได้ว่าทั้งไธอะมีนไฮโดรคลอไรด์ และสารสกัดจากยีสต์มีผลต่อการเติบโตและการผลิตกรดมะนาว ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไปจะศึกษาปริมาณที่เหมาะสมของสารทั้งสองชนิดต่อการผลิตกรดมะนาวของ Candida oleophila C-73

ตารางที่ 16 ผลของไธอะมีนไฮโดรคลอไรด์และสารสกัดจากยีสต์ต่อการเติบโต และการผลิตกรดมะนาวของ Candida oleophila C-73

ชนิดของสาร	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	กรดมะนาว (กรัม/ลิตร)
ชุดที่ไม่มีการเติมสารทั้งสองชนิด	9.6	54.0
ชุดควบคุม*	17.9	120.0
สารสกัดจากยีสต์**	17.2	120.0
ไธอะมีนไฮโดรคลอไรด์***	9.8	60.0

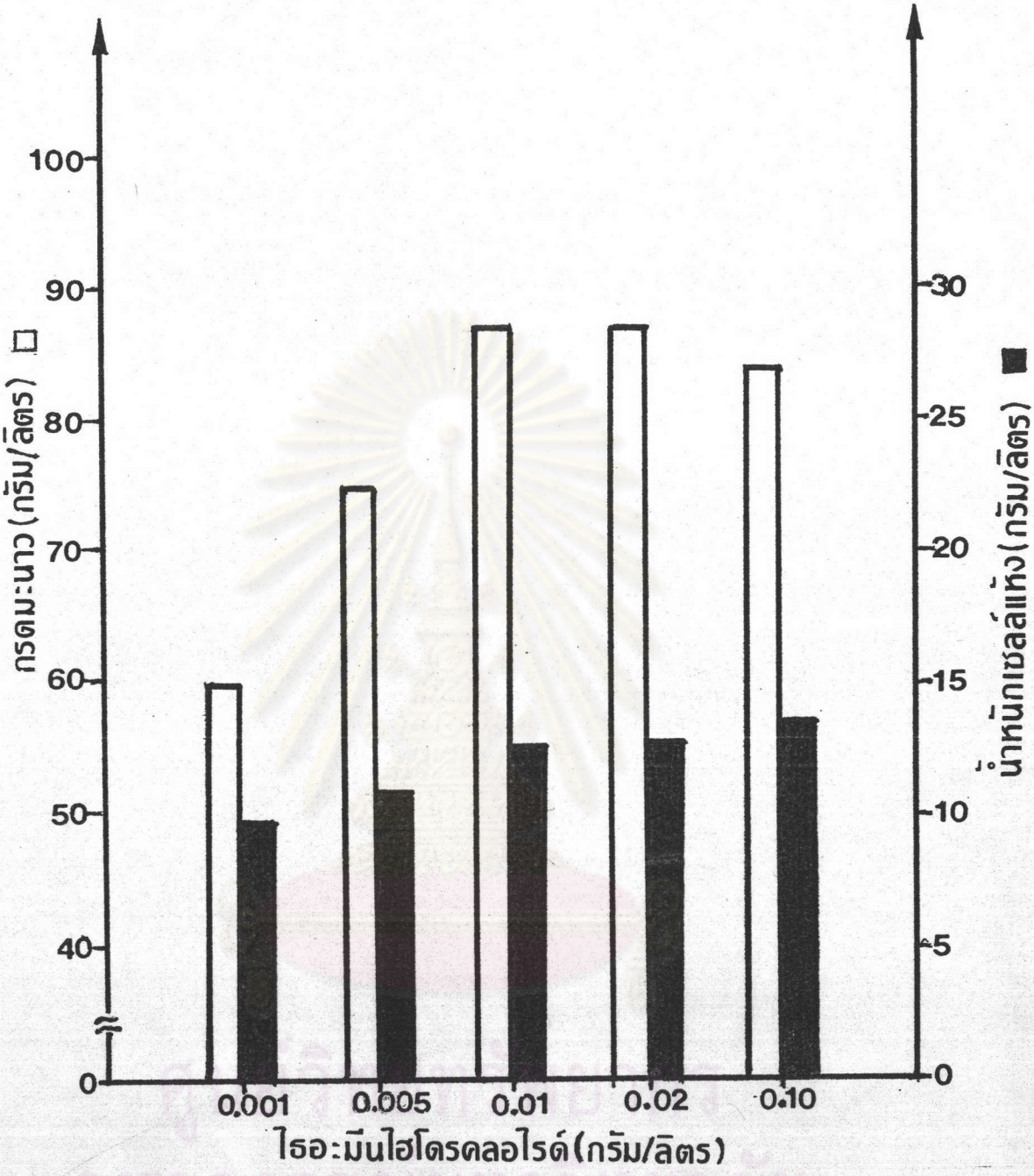
หมายเหตุ * หมายถึง อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมทั้งสารสกัดจากยีสต์ความเข้มข้นร้อยละ 0.1และไธอะมีนไฮโดรคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.0001(น้ำหนักต่อปริมาตร)

** หมายถึง อาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมเฉพาะสารสกัดจากยีสต์ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 (น้ำหนักต่อปริมาตร)

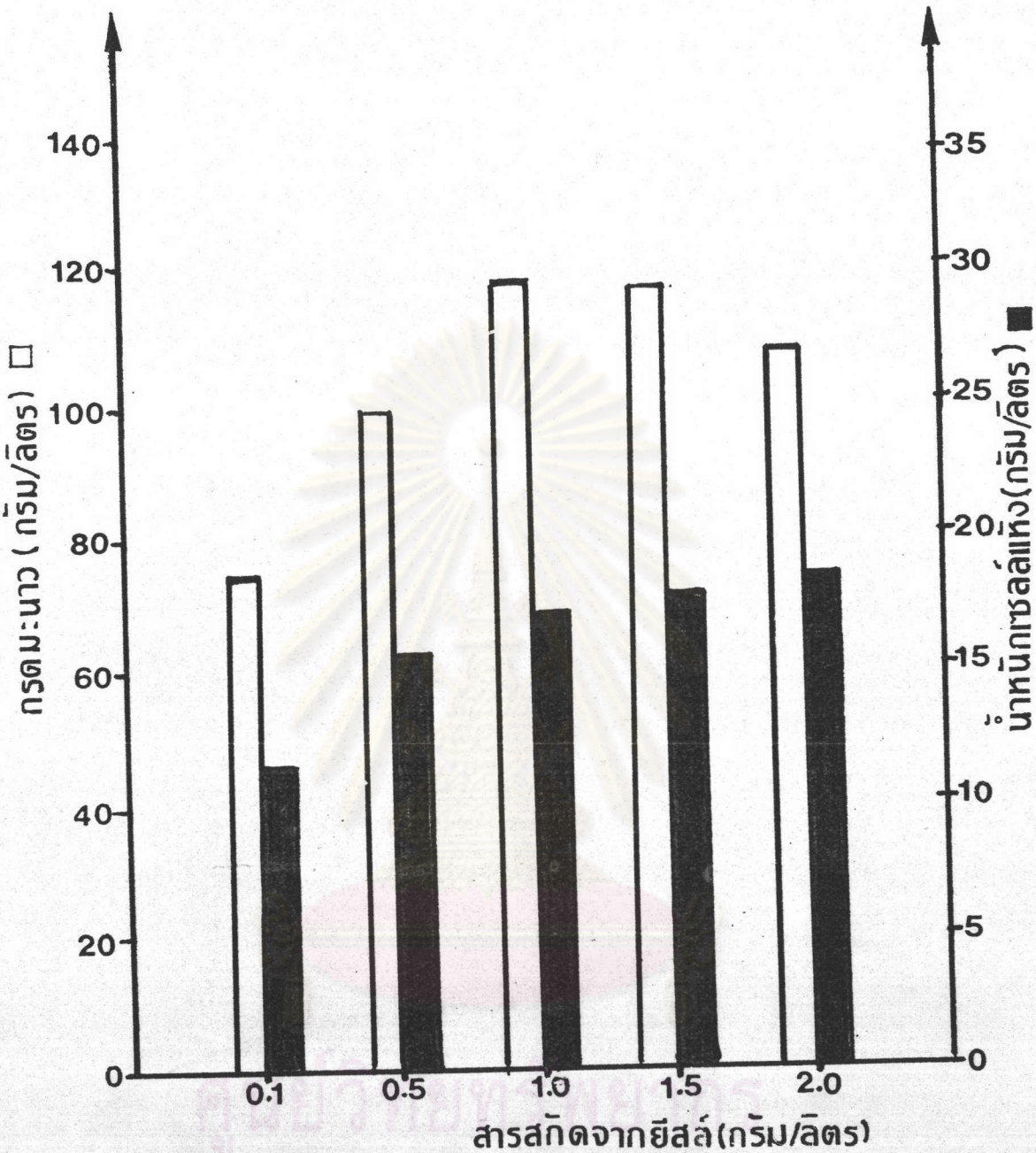
*** หมายถึง อาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมเฉพาะไธอะมีนไฮโดรคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.0001(น้ำหนักต่อปริมาตร)

5.7.2 ผลของสารสกัดจากยีสต์ หรือไธอะมีนไฮโดรคลอไรด์

จากการทดลองในข้อ 5.7.1 พบว่าทั้งสารสกัดจากยีสต์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1หรือไธอะมีนไฮโดรคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.0001(น้ำหนักต่อปริมาตร) มีผลต่อการเติบโตและการผลิตกรดมะนาวของเชื้อ Candida oleophila C-73 ดังนั้น การทดลองนี้จะศึกษาผลของความเข้มข้นของสารสกัดจากยีสต์ หรือไธอะมีนไฮโดรคลอไรด์ โดยแปรผันความเข้มข้นของสารสกัดจากยีสต์เท่ากับร้อยละ 0.01-0.20 (น้ำหนักต่อปริมาตร) หรือความเข้มข้นของไธอะมีนไฮโดรคลอไรด์เท่ากับร้อยละ 0.0001-0.01 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เลี้ยงเชื้อ Candida oleophila C-73 ในอาหารเลี้ยงเชื้อตามสูตรอาหารในภาคผนวกที่ 1.13 และใช้สภาวะการเลี้ยงเชื้อเช่นเดียวกันกับข้อ 5.7.1 วิเคราะห์หาน้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณกรดมะนาว ตามวิธีการทดลองในข้อ 2.3.1 และ 2.3.2 ตามลำดับ ผลการทดลอง(รูปที่ 28) พบว่า ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมไธอะมีนไฮโดรคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.001 หรือ 0.002(น้ำหนักต่อปริมาตร)จะให้ปริมาณกรดมะนาวสูงสุดเท่ากันคือ 87.0 กรัมต่อลิตร และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของไธอะมีนไฮโดรคลอไรด์ขึ้น การผลิตกรดมะนาวของ Candida oleophila C-73 กลับลดลงเล็กน้อยเหลือ 84.0 กรัมต่อลิตร ส่วนในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมสารสกัดจากยีสต์ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 หรือ 0.015(น้ำหนักต่อปริมาตร) พบว่าปริมาณกรดมะนาวสูงสุดที่ผลิตได้มีค่าเท่ากันคือ 120 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีปริมาณสูงกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมไธอะมีนไฮโดรคลอไรด์ แสดงว่าการเติมสารสกัดจากยีสต์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1(น้ำหนักต่อปริมาตร) เพียงชนิดเดียวเพียงพอสำหรับเป็นแหล่งอาหารเสริมให้กับเชื้อ Candida oleophila C-73 ในการผลิตกรดมะนาว(รูปที่ 29) ดังนั้น ในการทดลองขั้นต่อไปจะเปรียบเทียบการผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อ Candida oleophila C-73 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้คอร์นสตรีปลิเคอร์ความเข้มข้นต่างๆกันเป็นแหล่งอาหารเสริมแทนสารสกัดจากยีสต์



รูปที่ 28 ผลของไธอะมีนไฮโดรคลอไรด์ต่อการเติบโตและการผลิตกรดมะนาวของเชื้อ Candida oleophila C-73

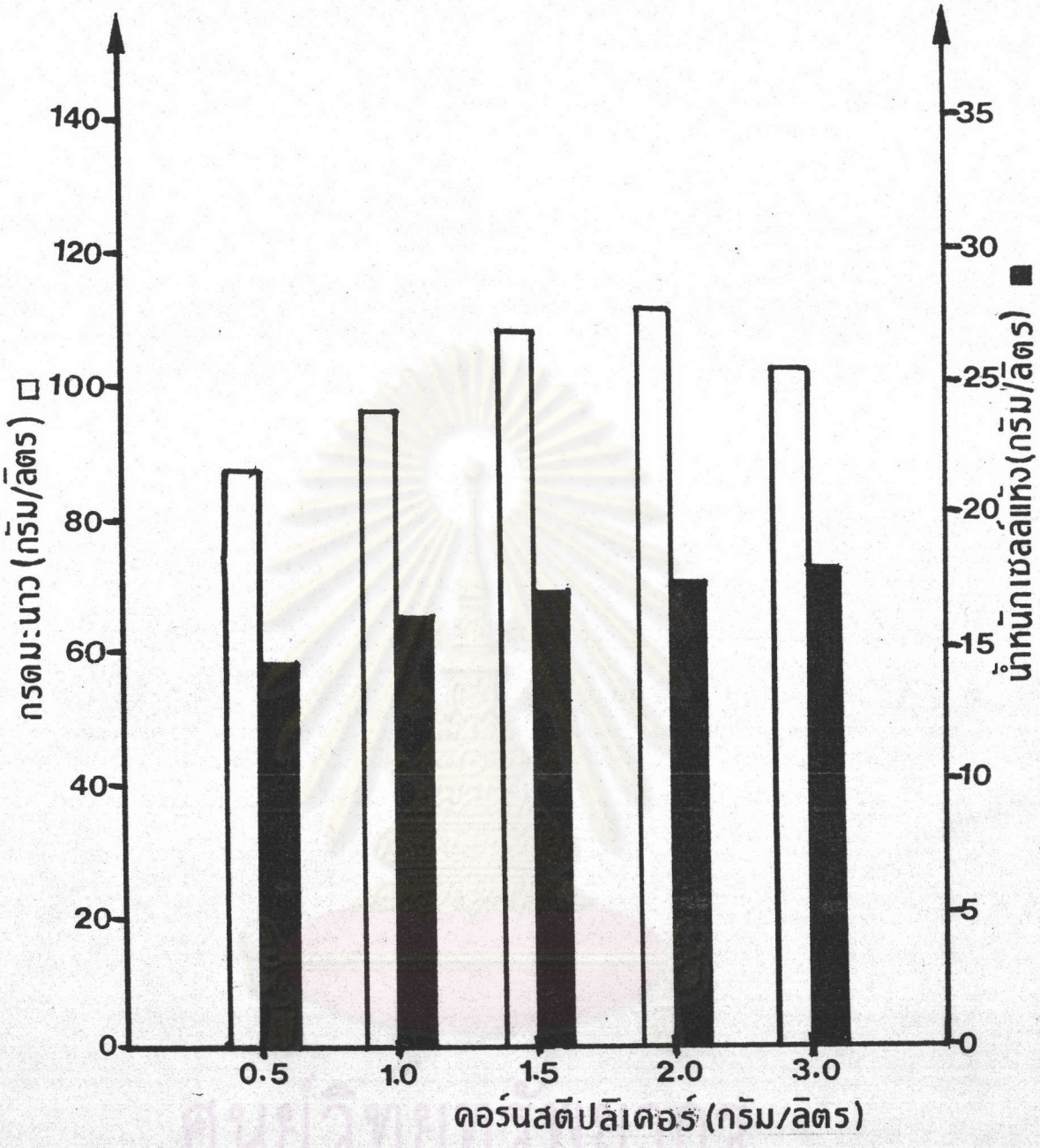


รูปที่ 29 ผลของสารสกัดจากยีสต์ต่อการเติบโตและการผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อ Candida oleophila C-73

5.7.3 ผลของคอร์นสตีปลิเคอร์

จากรายงานการศึกษาที่ผ่านมา พบว่า มีการใช้คอร์นสตีปลิเคอร์[25, 45] เป็นแหล่งของสารที่ช่วยเสริมการเติบโต เช่น วิตะมินชนิดต่างๆ ซึ่งอาจใช้แทนสารสกัดจากยีสต์ได้ ดังนั้นในการทดลองนี้จะศึกษาผลของคอร์นสตีปลิเคอร์ต่อการเติบโตและการผลิตกรดมะนาวของเชื้อ Candida oleophila C-73 โดยจะใช้คอร์นสตีปลิเคอร์แทนสารสกัดจากยีสต์ในอาหารสูตรเดียวกัน(ภาคผนวกที่ 1.13) แปรผันความเข้มข้นตั้งแต่ร้อยละ 0.05-0.3 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เลี้ยงเชื้อ Candida oleophila C-73 ในสภาวะเช่นเดียวกันกับข้อ 5.7.2 วิเคราะห์หาน้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณกรดมะนาวตามวิธีการทดลองในข้อที่ 2.3.1 และ 2.3.2 ตามลำดับ ผลการทดลอง(รูปที่ 30) พบว่า ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมคอร์นสตีปลิเคอร์ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 แทนสารสกัดจากยีสต์ Candida oleophila C-73 สามารถผลิตกรดมะนาวได้สูงสุดคือ 111.0 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีปริมาณน้อยกว่าเมื่อเติมสารสกัดจากยีสต์ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 กรัมต่อลิตร(120 กรัมต่อลิตร) และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของคอร์นสตีปลิเคอร์ขึ้นมากกว่าร้อยละ0.2 ปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้จะลดลง แต่การเติบโตของเชื้อจะเพิ่มขึ้น ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไปจะเติมสารสกัดจากยีสต์ความเข้มข้นร้อยละ0.1(น้ำหนักต่อปริมาตร) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อใช้เป็นแหล่งของวิตะมินในการผลิตกรดมะนาวของ Candida oleophila C-73

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 30 ผลของคอร์นสตีปลิเคอร์ต่อการเติบโตและการผลิตกรดมะนาวโดย Candida oleophila C-73

5.8 ผลของแคลเซียมคาร์บอเนต

ในการผลิตกรดมะนาวจากนอร์มัลพาราฟฟินส์โดยใช้ยีสต์ ในระดับขวดเขย่านั้น ไม่มีระบบควบคุมค่าความเป็นกรดด่าง ดังนั้นการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตเพื่อใช้ในการสะเทินกรดที่เกิดขึ้นในระหว่างการหมักจึงจำเป็นอย่างยิ่ง ซึ่งปริมาณที่ใช้มากน้อยย่อมขึ้นกับปริมาณกรดที่ถูกผลิตขึ้น ดังนั้นในการทดลองนี้จะหาปริมาณที่เหมาะสมของแคลเซียมคาร์บอเนตต่อการผลิตกรดของเชื้อ Candida oleophila C-73 โดยทำการแปรผันความเข้มข้นของแคลเซียมคาร์บอเนตเท่ากับร้อยละ 0.0 8.0 10.0 12.0 และ 14.0 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ในอาหารเลี้ยงเชื้อตามสูตรอาหารในภาคผนวกที่ 1.14 และเลี้ยงเชื้อในสภาวะเช่นเดียวกับข้อ 5.7.3 วิเคราะห์หาน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดมะนาว และวัดค่าความเป็นกรดด่าง ตามวิธีการทดลองในข้อ 2.3.1 และ 2.3.2 ตามลำดับ ผลการทดลอง(ตารางที่ 17) พบว่า ความเข้มข้นของแคลเซียมคาร์บอเนตมีผลต่อการผลิตกรดมะนาว ปริมาณการผลิตกรดมะนาวจะสูงสุด (120 กรัมต่อลิตร) เมื่อความเข้มข้นของแคลเซียมคาร์บอเนตเท่ากับร้อยละ 10 (น้ำหนักต่อปริมาตร) และเมื่อเพิ่มปริมาณการผลิตกรดมะนาวขึ้นเป็นร้อยละ 12 จะเห็นได้ว่าปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้ มีค่าใกล้เคียงกับการใช้แคลเซียมคาร์บอเนตที่ความเข้มข้นร้อยละ 10 แสดงว่าปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตดังกล่าว เพียงพอต่อการสะเทินกรดที่ผลิตขึ้นโดย Candida oleophila C-73 ตลอดระยะเวลาในการหมัก ดังนั้นจะใช้ความเข้มข้นของแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 10 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นสารที่ใช้ปรับค่าความเป็นกรดด่างในระหว่างการหมักเพื่อผลิตกรดมะนาวของเชื้อ Candida oleophila C-73

ตารางที่ 17 ผลของแคลเซียมคาร์บอเนตต่อการเติบโตและการผลิตกรดมะนาวของเชื้อ Candida oleophila C-73

แคลเซียมคาร์บอเนต (ร้อยละ)	ค่าความเป็นกรดด่าง		เวลา* (วัน)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	กรดมะนาว (กรัม/ลิตร)
	เริ่มต้น	สุดท้าย			
0	5.56	2.83	2	0.5	0.4
8	8.09	3.63	6	16.6	108.0
10	8.11	4.32	6	17.0	120.0
12	8.13	5.24	6	17.0	118.5
14	8.18	5.99	6	16.8	109.5

หมายเหตุ * หมายถึง ระยะเวลา(วัน)ของการหมักที่ให้ผลผลิตกรดมะนาวสูงสุด

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

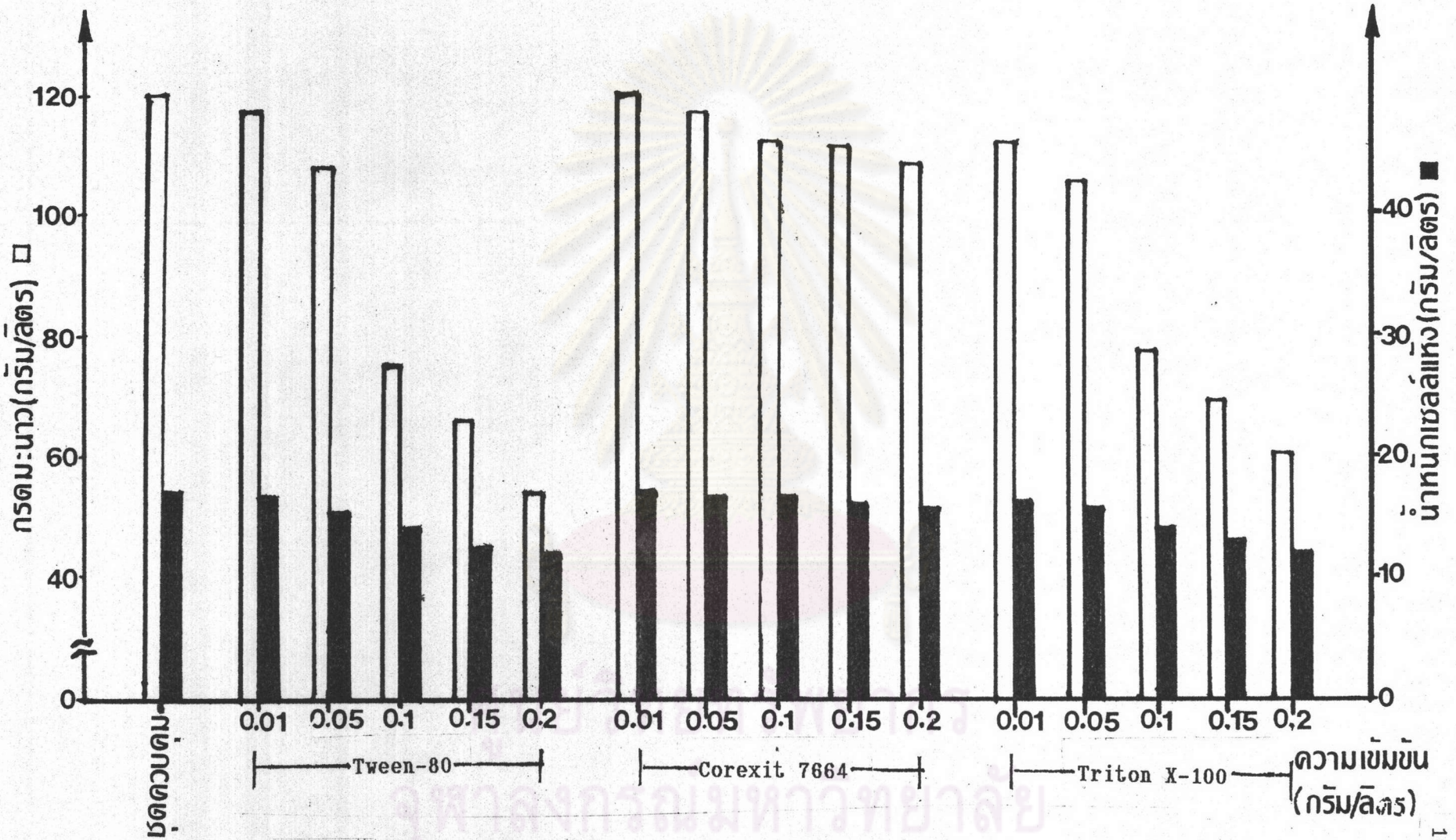
5.9 ผลของสารพิเศษที่เติมในอาหารเลี้ยงเชื้อ

5.9.1 ผลของสารลดแรงตึงผิว

เลี้ยงเชื้อ Candida oleophila C-73 ในอาหารเลี้ยงเชื้อตามสูตรอาหารในภาคผนวกที่ 1.15 แปรผันความเข้มข้นของ Corexit 7664 Tween 80 หรือ Triton X-100 ตั้งแต่ร้อยละ 0.001-0.02 (น้ำหนักต่อปริมาตร) และเลี้ยงเชื้อโดยใช้สภาวะเช่นเดียวกับข้อ 5.8 วิเคราะห์หาน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดมะนาวตามวิธีการทดลองในข้อ 2.3.1 และ 2.3.2 ตามลำดับ ผลการทดลอง(รูปที่ 31) พบว่า การเติมสารลดแรงตึงผิวทุกชนิดไม่มีผลต่อการเพิ่มการเติบโต และการผลิตกรดมะนาวของเชื้อ Candida oleophila C-73 และยังได้พบว่าการเติบโต และการผลิตกรดมะนาวกลับมีค่าลดลง เมื่อความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวสูงขึ้น โดยเฉพาะเมื่อใช้ Tween 80 หรือ Triton X-100 ดังนั้นในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดมะนาวของ Candida oleophila C-73 ในระดับขวดเขย่าไม่จำเป็นจะต้องเติมสารลดแรงตึงผิวชนิดใดๆ แต่ถ้าเป็นการผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาดใหญ่ การใช้สารลดแรงตึงผิวชนิด Corexit 7664 อาจมีประโยชน์ต่อการผลิตกรดมะนาวได้ เนื่องจากที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.001-0.005 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ไม่มีผลยับยั้งการเติบโตและการผลิตกรดมะนาวของเชื้อ Candida oleophila C-73

5.9.2 ผลของสารแยกการควบคู่(uncoupling agent)

สารแยกการควบคู่ที่นิยมใช้ในการเพิ่มผลผลิตกรดมะนาว คือ 2,4-ไดไนโตรฟีนอล(2,4-dinitrophenol)[20] ดังนั้น ในการทดลองนี้จะศึกษาผลของ 2,4-ไดไนโตรฟีนอล โดยเลี้ยงเชื้อ Candida oleophila C-73 ในอาหารเลี้ยงเชื้อตามสูตรอาหารในภาคผนวกที่ 1.16 แปรผันความเข้มข้นตั้งแต่ร้อยละ 5.0×10^{-4} ถึง 2.0×10^{-3} (น้ำหนักต่อปริมาตร) และเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเวลาต่างๆกันคือ 0 12 24 และ36 ชั่วโมง เลี้ยงเชื้อในสภาวะเช่นเดียวกับข้อ 5.9.1 วิเคราะห์หาน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณกรดมะนาว ตามวิธีการทดลองในข้อ 2.3.1 และ 2.3.2 ตามลำดับ ผลการทดลอง(ตารางที่ 18) พบว่า เชื้อ Candida oleophila C-73 สามารถผลิตกรดมะนาวได้สูงสุดเพิ่มขึ้นจาก 120 กรัมต่อลิตร(ชุดควบคุม) เป็น 131.5 กรัมต่อลิตร



รูปที่ 31 ผลของชนิดและปริมาณของสารลดแรงตึงผิวต่อการเติบโตและการผลิตกรดมะนาว โดยเชื้อ Candida oleophila C-73

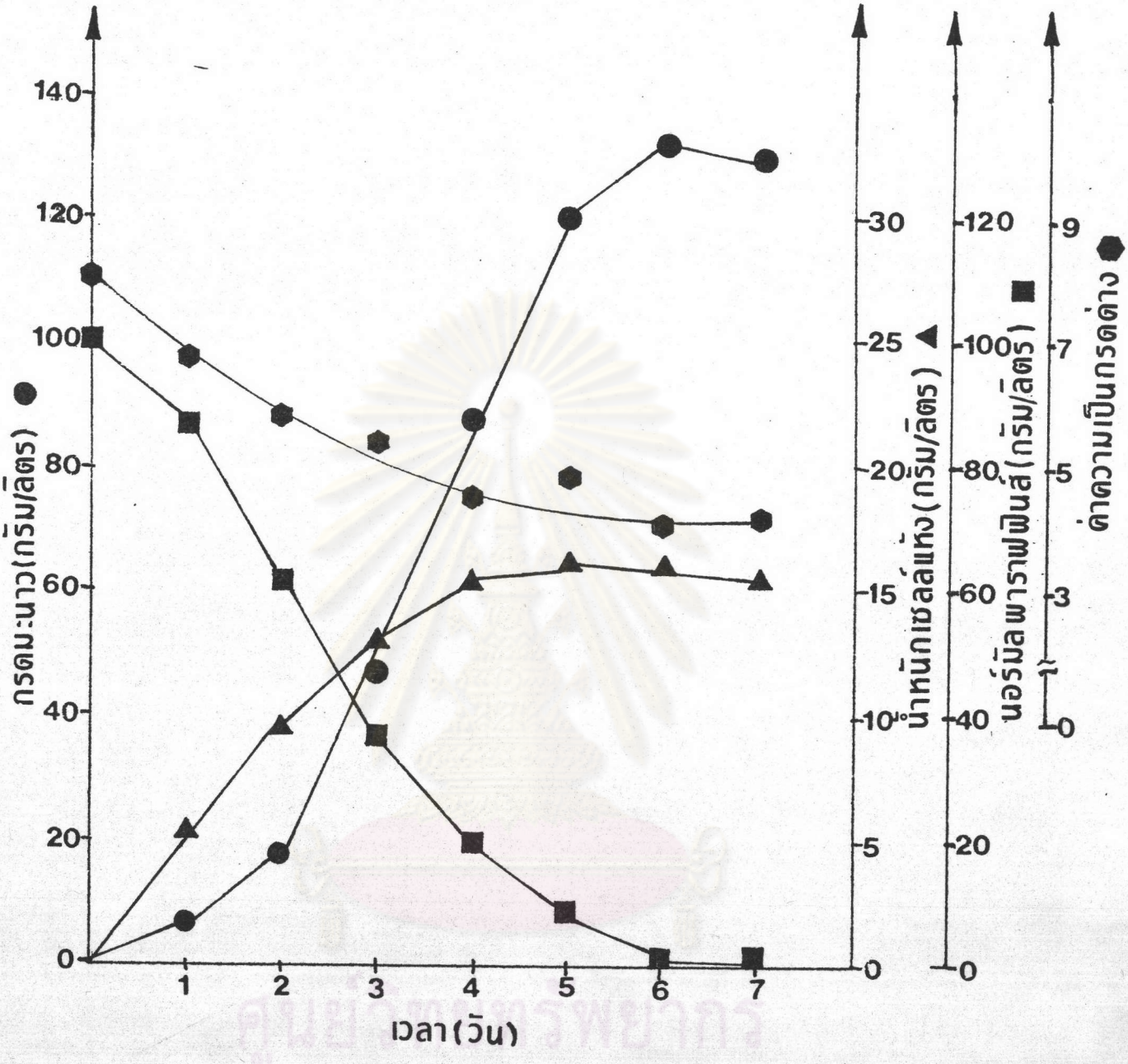
ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติม 2,4-ไดไนโตรฟีนอลความเข้มข้นร้อยละ $1x10^{-3}$ (น้ำหนักต่อปริมาตร) หลังการเลี้ยงเชื้อนาน 24 ชั่วโมง โดยใช้ระยะเวลาในการหมักนาน 6 วัน แต่น้ำหนักเซลล์แห้งจะลดลงจาก 17.2 กรัมต่อลิตร เป็น 16.2 กรัมต่อลิตร โดยมีรูปแบบการเติบโตและการผลิตกรดมะนาวของเชื้อ Candida oleophila C-73 ดังแสดงในรูปที่ 32

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 18 ผลของ 2,4-ไดไนโตรฟีนอลที่เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เวลาต่างๆกันต่อการเติบโตและการผลิตกรดมะนาวของ Candida oleophila C-73

2,4-ไดไนโตรฟีนอล		น้ำหนักเซลล์แห้ง	กรดมะนาว
ความเข้มข้น (ร้อยละ)	เวลาที่เติม (ชั่วโมง)	(กรัม/ลิตร)	(กรัม/ลิตร)
ชุดควบคุม*		17.2	120.0
	0	13.8	105.0
	12	16.4	111.0
$5x10^{-4}$	24	16.8	123.0
	36	16.6	121.5
	0	12.5	99.0
	12	15.7	114.0
$1x10^{-3}$	24	16.2	131.5
	36	14.9	123.0
	0	10.7	75.0
	12	12.8	87.0
$2x10^{-3}$	24	14.4	105.0
	36	15.1	112.5

หมายเหตุ ชุดควบคุม * หมายถึง ชุดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เติม 2,4-ไดไนโตรฟีนอล



รูปที่ 32 รูปแบบการเติบโตและการผลิตกรดมะนาวของ Candida oleophila C-73 เมื่อเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติม 2,4-ไดไนโตรฟีนอล ความเข้มข้น 0.01 กรัม/ลิตร หลังการหมักนาน 24 ชั่วโมง