รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

ธีรวัฒนา ภาระมาตย์. 2540. การผลิตกรดมะนาวจากเซลล์ตรึง *Candida oleophila* C-73 ในถังหมักแบบไม่ต่อเนื่องขนาด 5 ลิตร. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ประเสริฐ หาญเมืองใจ. 2537. การผลิตกรดมะนาวจากแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยแล้วด้วยยีสต์ *Candida oleophila* C-73. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

พระราชบัญญัติมาตรฐานอุตสาหกรรม (กรดซิตริก) พ.ศ. 2535. ราชกิจจานุเบกษา 109 (15 ธันวาคม 2535): 2.

เรวดี เลิศไตรรักษ์. 2535. กรดมะนาวจากนอร์มัล พาราฟินส์โดยวิธีการหมักในอาหารเหลวด้วยยีสต์. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ภาษาอังกฤษ

Abou-Zeid, A.A. and Ashy, M.A. 1984. Production of citric acid : a review. Agric. Wastes.9 : 51-59.

Aiba, S., Humphrey, A.E. and Mills, N.F. 1973. Biochemical Engineering. 2ed. New York : Acadamic Press.

Aiba, S.and Matsuoka, N. 1979. Identification of metabolic model : citrate production from glucose by *Candida lipolytica*. Biotechnology and Bioengineering 21 : 1373-1386.

Akiyama, S., Suzuki, T., Sumino, Y., Nakao,Y. and Fukuda, H. 1973. Elationship between aconitate hydratase activity and citric acid production in fluoroacetate-sensitive mutant strain of *Candida lipolytica*. Agricultural and Biological Chemistry 37(4) : 885-888.

Asenjo, J.A., Szuhay, J. and Chiu, D. 1982. Growth and citric acid production by *Candida guilliermondii* using a cellulose substrate. Biotechnology and Bioengineering Symp. 12 : 111-120.

Bernfeld, P. 1957. Amylase, α and β. In colowick, S.P. and Kaplan, N.O.(eds.), Method in Enzymology, vol.3, pp. 149-150. New York : Acadamic Press.

Bouchard, E.F. and Merritt, E.F. 1979. Kirk-Other Encyclopedia of Chemical Technology, vol.6, pp. 150-179. New York : John Wiley & Sons.

Briffaud, J. and Engaser, M. 1979. Citric acid production from glucose. I Growth and excretion kinetics in a stirred fermentor. Biotechnology and Bioengineering 21 : 2083-2092.

Cartledge, T.G. 1987. Substrates utilization, non-carbohydrate substrate. In Berry, D.R., Russell, I. and Stewart, G.G.(eds.), Yeast Biotechnology, pp.331-342. London : Alleo and Unwin.

Cassio, F. and Leao, C. 1991. Low-and high-affinity transport systems for citric acid in the yeast *Candida utilis*. Applied and Environmental Microbiology 57 (12) : 3623-3628.

Charles, M. 1985. Fermenter design and scale-up. In C.L.Cooney, and A.E.Humphrey (eds.), Comprehensive Biotechnology, vol.2 pp.57-75. New York : Programon Press.

Chung, B.H. and Chang, H.N. 1988. Application of citric acid of Fed-batch culture to citric acid production by *Aspergillus niger* : The effects of dilution rate and dissolved oxygen tension. Biotechnology and Bioengineering 32 : 220-226.

Crueger, W., and Crueger, A. 1984. Biotechnology : A text of Industrial Microbiology, In D. Brock (ed.).chap.5, pp.54-97. Madison : Science Tech, Inc.

Dewitt, J.P., Jackon, J.V., and Paulus, T.J. 1989. Scale-up. In J.O.Neway (ed.), Fermentation Process Development of Industrial Organism, pp.27-71. New York : Dekker.

Elander, R.P. 1989. Bioprocess technology in industrial fungi. In J.O.Neway (ed.). Fermentation Process Development of Industrial Organism, pp. 162-219. New York : Dekker.

Enzminger, J.D. and Asenjo, J.A. 1986. Use of cell recycle in aerobic fermentative production of citric acid by yeast. Biotechnology Letters. 8(1) : 7-12.

Ermakova, I.T., Shishlanova, N.V., Melnikova, P.F. and Finogenova, T.V. 1986. Properties of *Candida lipolytica* mutants with the modified glyoxylate cycle and their ability to produce citric and isocitric acid. Applied Microbiology and Biotechnology 23 : 372-377.

Fired, J.H. 1972. Method of producing citric acid by fermentation. US patent 3,632,476.

Furukawa, T., Matsuyoshi, T., Minoda, Y. and Yamada, K. 1977. Fermentative production of citric acid from n-paraffins by yeast. Journal of Fermentation Technology 55(4) : 356-363.

Gledhill, W.E., Hill, I.D. and Hodson, P.H. 1973. Citrate production from hydrocarbons by use of nonsterile, semicontinuous cell recycle system. Biotechnology and Bioengineering 15 : 963-972.

Goldberg, I., Peleg, Y. and Roken, J.S. 1991. Citric, Fumaric and Malic Acid. Biotechnology and Food Ingredients, pp.349-358. New York : Van Nostand Reinhold.

Grewal, H.S., and Kalra. 1995. Fungal production of citric acid. Biotechnology Advance. 13(2) : 209-234.

Hall, M.J., Dickenson, S.D., Pritchard, R. and Evans, J.I. 1973. Foams and foam control in fermentation processes. Prog. Industr. Microbiol. 12 : 169-234.

Hamissa. 1978. Effect of alcohol and retared compounds on citric acid from beet molasses by *Aspergillus niger*. Chem. Microbiol. Technol. 5 : 157-160.

Huggett, A.G. and Nixon, D.A. 1957. Enzymatic determination of blood glucose. Biochem. J. 66 (1) : 12.

Hustede, H. and Sibert, D. 1974. Production of citric acid from hydrocarbon. US patent 3,843,465.

Iizuka, H., Shimizu, J., Ishii, K. and Nakajima, Y. 1971. Process for the production of citric fermentation. US patent 3,622,455.

Ikeno, Y., Masuda, M., Tanno, K., Oomari, I. and Akahashi, N. 1975. Citric acid production from various raw materials by yeast. Journal of Fermentation Technology 53(10) : 752-756.

Kautola, H., Rymowicz, W., Linko, Y. and Linko, P. 1991. Production of citric acid with immobilized *Yarrowia lipolytica*. Applied Microbiology and Biotechnology 35 : 447-449.

Klasson, T.K., Clausen, E.C. and Gaddy, J.L. 1989. Continuous fermentation for the production of citric acid from glucose. Applied Biochemistry and Biotechnology 20(21) : 491-509.

Kristiansen, B. and Chambelain, H.E. 1983. Fermenter design. In J.F. Smith and D.R. Berry (eds.). The Filamentous Fungi, pp.1-7.

Kubicek, C.P. and Rohr, M. 1986. Citric acid fermentation. Critical Reviews In Biotechnology. 3 : 331-373.

Maddox, I.S., Spencer, K., Greenwood, J.M., Dawson, M.W. and Brooks, J.D. 1985. Production of citric acid from sugars present in wood hemicellulose using *Aspergillus niger* and *Saccharomycopsis lipolytica*. Biotechnology Letters 7 : 815-818.

Marison, W. 1988. Citric acid production. In Scragg, A.H.(ed.). Biotechnology for Engineer : Biological Systems in Technological Process, pp.322-336. New York : John Wiley & Sons.

Mattey, M. 1992. The production of organic acids. Critical Reviews In Biotechnology 12(1/2) : 87-132.

Mckay, I.A., Maddox, I.S. and Brooks, J.D. 1994. High specific rates of glucose utilisation under conditions of restricted growth are required for citric acid accumulation by *Yarrowia lipolytica* IMK 2. Applied Microbiology and Biotechnology 41 : 73-78.

Milsom, P.E. and Meers, J.R. 1985. Citric acid. In Moo-Young, M.(ed.). Comprehensive Biotechnology, vol.3 pp.665-681. London : Pergamon Press.

Miura, Y. 1976. Transfer of oxygen and scale-up in submerged aerobic fermentation. Adv. In Biochem. Eng. 4 : 3-40.

Moresi, M. 1994. Effect of glucose concentration on citric acid production by *Yarrowia lipolytica*. Journal of Chemical Technology and Biotechnology 60 : 387-395.

Nakanishi, T., Yamamoto, M., Kimura, K. and Tanaka, K. 1972. Fermentative production of citric acid from n-paraffin by yeast. Journal of Fermentation Technology 50(12) : 855-867.

Okoshi, H., Sato, S., Mukataka, S. and Takahashi, J. 1987. Citric acid production by *Candida tropicalis* under high dissolved oxygen concentration. Agricultural and Biological Chemistry 51(1) : 257-258.

Pace, G.W. 1985. Scale-up of fermentation process. Proceeding of Biotech 85 Asia, pp.249-263.

Phaff, H.J., Miller, M.W. and Mark, E.M. 1978. The life of yeast. 2nd ed. USA : the President and Fellows of Harvard College.

Potvin, J., Desscrochers, M. and Acrand, Y. 1988. Fermentation of kraft black liquor for the production of citric acid by *Candida tropicalis*. Applied Microbiology and Biotechnology 2 : 350-355.

Prescott, S.C. and Dunn, C.G. 1959. The citric acid fermentation. Industrial Microbiology. (3rd ed.). pp.533-577. New York : Mcgraw-Hill.

Rane, K.D. and Sims, K.A. 1993. Production of citric acid by *Candida lipolytica* Y1095 : Effect of glucose concentration on yield and productivity. Enzyme Microb. Technol. 15 : 646-651.

Rane, K.D. 1994. Oxygen uptake and citric acid production by *Candida lipolytica* Y1095. Biotechnology and Bioengineering 43 : 131-137.

Robert, L.B., Philip, L.F. and John G.F. 1966. Impeller Characteristics and Power. In Vincent, W. UHL and Joseph, B.G. (eds.), Mixing Theory and Practice, vol.1 pp.111-178. New York : Academic Press.

Rottigni, C. and Cardini, G. 1981. Process for preparing citric acid by fermentation of carbohydrates. US patent 4,278,764.

Rymowicz, W., Kautola, H., Wojitatowicz, M., Linko, Y. and Linko, P. 1993. Study on citric acid production with immobilized *Yarrowia lipolytica* in repeated batch and continuous air-lift bioreactors. Applied Microbiology and Biotechnology 39 : 1-4.

Scragg, A.H. 1991. Bioreactor design. Bioreactor in Biotechnology. pp.112-125. Ellis Horwood Limited.

Shah, D.N., Chattoo, B.B., Kothari, R.M. and Hegde, M.V. 1993. Starch Hydrolysate, an optimal and economical source of carbon for the secretion of citric acid by *Yarrowia lipolytica* (DS-1). Starch/Starke 45 : 104-109.

Sikyta, B. 1983. Method in industrial Microbiology. Chichester : Ellis Horwood Limited.

Singleton, P. and Sainsbury, D. 1988. Dictionary of Microbiology and Molecular Biology. 2nd ed. Singapore : John Wiley & Sons.

Sokolov, D.M., Solodovnikova, N.Y., Sharyshev, A.A. and Finogenova, T.V. 1995. The role of NAD : isocitrate dehydrogenase in the biosynthesis of citric acid by yeast. Applied Biochemistry and Microbiology. 31(5) : 450-454.

Stanbury, P.F. and Whitaker, A. 1984. Principles of Fermentation Technology. Oxford : Pergamon Press.

Stern, J.R. 1957. Assay of tricarboxylic acids. In Colowick, S.P. and Kaphan, N.O.(eds.), Method in Enzymology, vol.3, pp.425-428. New York : Acadamic Press.

Tabuchi, T. and Igoshi, K. 1978. Regulation of enzyme synthesis of the glyocylate, the citric acid, and the methylcitric acid cycles in *Candida lipolytica*. Agricultural and Biological Chemistry 42(12) : 2381-2386.

Tani, Y., Sakai, Y. and Chou, S.G. 1990. Production of citric acid from methanol by a fluoroacetate-resistant mutant of *Candida sp.*Y-1. Applied Microbiology and Biotechnology 34 : 5-9.

Wang, D.I.C., Cooney, C.L., Demain, A.L., Dunnill, P., Humphrey, A.E., Lilly, M.D. 1979. Fermentation and Enzyme Technology. New : John Wiley & Sons.

Wejtatowicz, M., Rymowicz, W. and Kautola, H. 1991. Comparison of different strains of the yeast *Yarrowia lipolytica* for citric acid production from glucose hydrolysate. Applied Biochemistry and Biotechnology 31 : 165-174.

ภาคผนวก ก

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการเจริญ (Yeast Malt Extract Medium)

1.1 อาหารเหลว

ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร ประกอบด้วย

กลูโคส	10.0	กรัม
เปปโตน	5.0	กรัม
สารสกัดจากมอลต์	3.0	กรัม
สารสกัดจากยีสต์	3.0	กรัม

ใส่อาหารเหลวสำหรับการเจริญเติบโต ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.2 อาหารแข็งลาดเอียง (YM Slant)

เตรียมได้โดยเติมวุ้นผง 20.0 กรัม ลงในอาหารเหลวสำหรับการเจริญ ทำให้วุ้นละลาย ปิเปตใส่ในหลอดทดลองหลอดละ 6.0 มิลลิลิตร ปิดด้วยจุกสำลี แล้วนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. อาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาว

2.1 อาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาว (ประเสริฐ,2537) ในระดับขวดเขย่า

ในอาหาร 1 ลิตร มีส่วนประกอบดังนี้

แป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ (ภาคผนวก ฉ) มีน้ำตาลกลูโคส	200.0	กรัม
แอมโมเนียมคลอไรด์	2.0	กรัม
โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.2	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต	0.5	กรัม

แมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรต	0.2	กรัม
สารสกัดจากยีสต์	1.0	กรัม
แคลเซียมคาร์บอเนต	100.0	กรัม

ใส่อาหารปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส ความดัน 7.2 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 30 นาที

2.2 อาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาวในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร เมื่อใช้แคลเซียมคาร์บอเนตในการควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่าง

ในอาหาร 1 ลิตร มีส่วนประกอบเช่นเดียวกับในข้อ 2.1 (โดยจะเปลี่ยนแปลงตามปัจจัยที่ต้องการศึกษา) แต่แยกสารออกเป็น 2 ส่วน คือ

1. แป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์และกำจัดกากออกแล้ว

2. แอมโมเนียมคลอไรด์ โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต สารสกัดจากยีสต์ และแคลเซียมคาร์บอเนต

ส่วนที่ 1 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส ความดัน 7.2 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 30 นาที ส่วนที่ 2 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อพร้อมถังหมัก และสารควบคุมการเกิดฟองที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที โดยใช้ปริมาตรอาหารเริ่มต้น 3.5 ลิตร

2.3 อาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาวในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร เมื่อใช้แคลเซียมออกไซด์ในการควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่าง

ในอาหาร 1 ลิตร มีส่วนประกอบและวิธีการเตรียมเช่นเดียวกับในข้อ 2.2 ยกเว้นสารควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างจะใช้แคลเซียมออกไซด์ซึ่งเตรียมในรูปสารแขวนลอยในน้ำปริมาณร้อยละ 30 น้ำหนักต่อปริมาตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที โดยใช้ปริมาตรอาหารเริ่มต้น 3.0 ลิตร

2.4 อาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาวในระดับถังหมักขนาด 12.5 ลิตร

ในอาหาร 1 ลิตร มีส่วนประกอบดังนี้คือ

แป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ มีน้ำตาลกลูโคส	200.0	กรัม
แอมโมเนียมคลอไรด์	2.0	กรัม

โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.2	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต	0.5	กรัม
แมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรต	0.2	กรัม
สารสกัดจากยีสต์	1.0	กรัม
แคลเซียมคาร์บอเนต	100.0	กรัม

โดยทำการแยกสารออกเป็น 2 ส่วน เช่นเดียวกับในข้อ 2.2 แต่ในส่วนที่ 2 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อแยกจากถังหมักที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที โดยใช้ปริมาตรอาหารเริ่มต้น 10 ลิตร ส่วนภายในถังหมักฆ่าเชื้อโดยใช้เทคนิค Tyndallization ผ่านไอน้ำจากหม้อไอน้ำ (boiler) อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ที่ความดันบรรยากาศเป็นจำนวน 3 ครั้ง ครั้งละประมาณ 1 ชั่วโมง โดยในแต่ละครั้งหลังผ่านไอน้ำจะรอจนถังหมักเย็นจึงจะผ่านไอน้ำครั้งต่อไป การผ่านไอน้ำในครั้งแรกจะกระตุ้นให้สปอร์ของเชื้อที่ปนเปื้อน พัฒนาเป็น vegetative cell ซึ่งจะถูกฆ่าโดยการผ่านไอน้ำในครั้งที่ 2 และ 3 (Scragg,1991)

ภาคผนวก ข

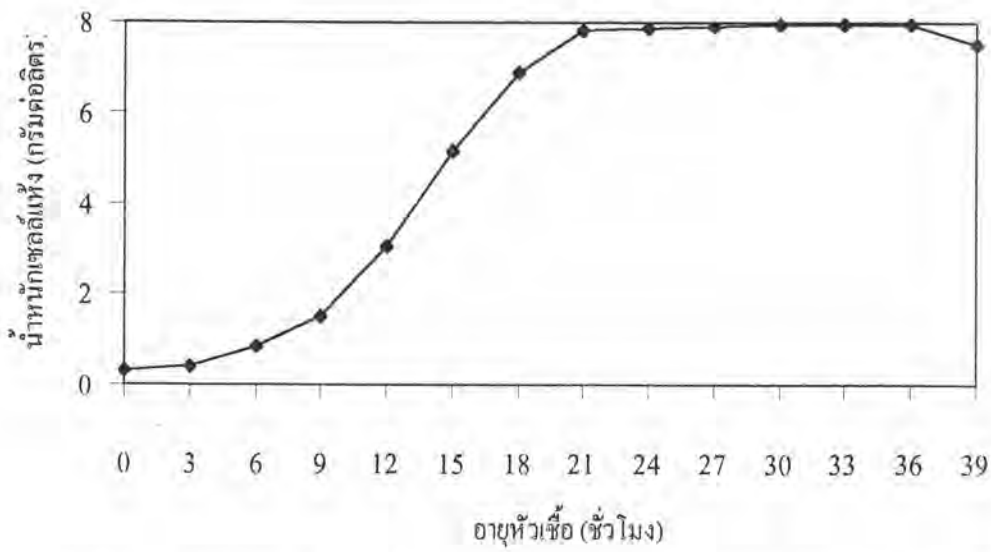
ลักษณะการเจริญของ *Candida oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับการเจริญเติบโต

จากการทดลองของ ประเสริฐ หาญเมืองใจ (2537) พบว่า ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการเจริญ (Yeast Malt Extract Medium) (ภาคผนวก ก1.1) ที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาวคือ ประมาณ 7 กรัมต่อลิตร ซึ่งอยู่ในช่วงท้ายของการเจริญแบบทวีคูณและเริ่มเข้าสู่ระยะของการเจริญแบบคงที่ โดยทำการเลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าแบบวงกลม ควบคุมอุณหภูมิที่ 28 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 ชั่วโมง

ดังนั้นจึงทำการเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* C-73 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการเจริญ (ภาคผนวก ก1.1) ตามวิธีการทดลองในข้อ 2.4.1 ติดตามการเจริญของเชื้อทุก 3 ชั่วโมง จนครบ 39 ชั่วโมง โดยวิธีหาน้ำหนักเซลล์แห้ง ผลที่ได้แสดงใน **ตารางที่ ข-1** และ**รูปที่ ข-1** พบว่าเชื้อจะอยู่ในระยะพักตัว (lag phase) ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 9 หลังจากนั้นเชื้อจะเจริญเพิ่มปริมาณขึ้นอย่างรวดเร็วจนถึงชั่วโมงที่ 18 จึงเข้าสู่ช่วงท้ายของการเจริญแบบทวีคูณและเริ่มเข้าสู่ระยะของการเจริญแบบคงที่ (stationary phase) รูปแบบการเจริญเติบโตในอาหารสำหรับการเจริญนี้จะมีปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งประมาณ 7 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 18 ซึ่งเป็นอายุของเชื้อ *Candida oleophila* C-73 ที่จะนำไปเลี้ยงในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวต่อไป

ตารางที่ ข-1 น้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อ *Candida oleophila* C-73 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการเจริญในระดับขวดเขย่า ที่ช่วงเวลาการเพาะเลี้ยงต่างๆ

เวลา(ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง(กรัมต่อลิตร)
0	0.31
3	0.42
6	0.83
9	1.50
12	3.05
15	5.14
18	6.87
21	7.81
24	7.85
27	7.92
30	7.94
33	7.95
36	7.94
39	7.52



รูปที่ ข-1 รูปแบบการเจริญของเชื้อ *Candida oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ

ภาคผนวก ค

การคำนวณเมื่อใช้เกณฑ์ทางกายภาพในการกำหนดการขยายส่วนของถังหมัก (Wang et al.,1979)

1. การคำนวณค่าความเร็วรอบของการกวน

1.1 ค่าเรโนลนัมเบอร์ (N_{Re}) ของถังหมักขนาด 12.5 ลิตร และ 5 ลิตร มีค่าเท่ากัน

จากสมการที่ 1

$$\text{Reynolds number} = \rho nDi^2 / \mu \qquad \text{——————} \quad 1$$

ความสัมพันธ์ที่เกิดขึ้นเมื่อภาวะการหมักเหมือนกันในการผลิตที่มีขนาดแตกต่างกันจะได้ดังสมการที่ 2

$$\text{Reynolds number} \propto nDi^2 \qquad \text{——————} \quad 2$$

$$n_1Di_1^2 = n_2Di_2^2$$

เมื่อ n_2 = ความเร็วรอบของการกวนในถังหมักขนาด 12.5 ลิตร

n_1 = ความเร็วรอบของการกวนในถังหมักขนาด 5 ลิตร

D_{i2} = เส้นผ่านศูนย์กลางของใบพัด 12.5 ลิตร

D_{i1} = เส้นผ่านศูนย์กลางของใบพัด 5 ลิตร

$$n_2 = (600 \times 7^2) / 18.5^2$$

$$= 85.90 \text{ รอบต่อนาที}$$

ดังนั้นความเร็วรอบของการกวนในถังหมักขนาด 12.5 ลิตร จะใช้ประมาณ 90 รอบต่อนาที

1.2 ความเร็วรอบของปลายใบพัด (πnD_i) ของถังหมักขนาด 12.5 ลิตร และ 5 ลิตร มีค่าเท่ากัน

จากสมการที่ 3

$$\text{Tip speed} \propto nDi \qquad \text{——————} \quad 3$$

ความสัมพันธ์ที่เกิดขึ้นเมื่อภาวะการหมักเหมือนกันในการผลิตที่มีขนาดแตกต่างกันจะได้

$$n_1Di_1 = n_2Di_2$$

$$n_1 = (600 \times 7) / 18.5$$

$$= 227.03 \text{ รอบต่อนาที}$$

ดังนั้นความเร็วรอบของการกวนในถังหมัก ขนาด 12.5 ลิตร จะใช้ประมาณ 230 รอบต่อนาที

1.3 อัตราส่วนระหว่างกำลังของมอเตอร์ต่อปริมาตรน้ำหมัก (Pg/V) ของถังหมักขนาด 12.5 ลิตร และ 5 ลิตร มีค่าเท่ากัน

จากสมการที่ 10

$$Pg / V = K_1 n^3 Di^5 \rho \qquad \text{——— 10}$$

ความสัมพันธ์ที่เกิดขึ้นเมื่อภาวะการหมักเหมือนกันในการผลิตที่มีขนาดแตกต่างกันจะได้

$$n_1^3 Di_1^2 = n_2^3 Di_2^2$$

$$n_2 = 600 \times (7 / 18.5)^{2/3}$$

$$= 313.88 \text{ รอบต่อนาที}$$

ดังนั้นความเร็วรอบของการกวนของถังหมักขนาด 12.5 ลิตร จะใช้ประมาณ 310 รอบต่อนาที

1.4 สัมประสิทธิ์ของการถ่ายเทออกซิเจน (K_La) ในถังหมักขนาด 12.5 ลิตร และ 5 ลิตร มีค่าเท่ากัน

จากสมการที่ 16

$$K_La = K (n)^{\alpha} (V_S)^{\beta} \qquad \text{——— 16}$$

เมื่อ K_La = สัมประสิทธิ์การส่งผ่านออกซิเจนต่อปริมาตร (ชั่วโมง$^{-1}$)

n = ความเร็วรอบของการกวน (รอบต่อนาที)

V_S = ความเร็วของอากาศ (the superficial gas velocity) (เซนติเมตรต่อวินาที)

= อัตราการไหลของอากาศ (ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที) / พื้นที่หน้าตัดของถังหมัก (ตารางเซนติเมตร)

เมื่อมีอัตราการไหลของอากาศ เท่ากับ 1 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที

สำหรับการหาค่า Parameter (α , β) และความเร็วรอบของการกวนของถังหมักในถังหมักขนาด 12.5 ลิตร จะแสดงรายละเอียดในภาคผนวก ง

2. การคำนวณเวลาที่ใช้ในการกวนผสมในถังหมักขนาด 12.5 ลิตร

จากสมการที่ 17

$$t_{m2} / t_{m1} = (Di_2 / Di_1)^{11/18} \qquad \text{——— 17}$$

เมื่อ t_{m2} = เวลาที่ใช้ในการกวนผสมในถังหมักขนาด 12.5 ลิตร (ชั่วโมง)

t_{m1} = เวลาที่ใช้ในการกวนผสมในถังหมักขนาด 5 ลิตร (ชั่วโมง)

$$t_{m2} = (18.5 / 7)^{11/18} \times 96$$

$$= 174 \text{ ชั่วโมง}$$

ดังนั้นเวลาที่ใช้ในการกวนผสมของถังหมัก 12.5 ลิตร จะทำการกวนผสมจนถึงชั่วโมงที่ 180 เนื่องจากต้องทำการเก็บตัวอย่างน้ำหมักทุกๆ 12 ชั่วโมง

ภาคผนวก ง

การคำนวณค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทออกซิเจน (K_La) และ Parameter (α,β) โดยวิธี Dynamic measurement (Wang et al.,1979)

อัตราการส่งผ่านออกซิเจน สามารถอธิบายได้โดยใช้สมการดังนี้

$$dC_L / dt = K_La (C^* - C_L) - rx \quad \text{——————} 18$$

เมื่อ C_L = ความเข้มข้นของออกซิเจนที่ละลายในอาหารเหลว (mmol / l)

C^* = ความเข้มข้นอิ่มตัวของออกซิเจนที่ละลายได้ในอาหารเหลว (mmol / l)

dC_L / dt = การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของออกซิเจนในระยะเวลาหนึ่งหรืออัตราการส่งผ่านออกซิเจน (mmol O_2 / l / h)

K_La = สัมประสิทธิ์การส่งผ่านออกซิเจนต่อปริมาตร (h^{-1}) (the mass transfer coefficient)

x = ความเข้มข้นของเซลล์ (g cell / l)

r = อัตราการหายใจจำเพาะของจุลินทรีย์ (mmol O_2 / g cell / h) (the specific oxygen uptake rate per unit weight of cells)

จากสมการที่ 18

$$dC_L = K_La (C^* - C_L) dt - rxdt$$

$$dC_L = (K_La\, C^* - rx) dt - K_LaC_Ldt$$

$$\int_{C_{Lo}}^{C_{Lf}} dC_L = (K_LaC^* - rx) \int_{t_o}^{t_f} dt - K_La \int_{t_o}^{t_f} C_Ldt$$

$$(C_{Lf} - C_{Lo}) = (K_LaC^* - rx) (t_f - t_o) - K_La \int_{t_o}^{t_f} C_Ldt$$

$$(C_{Lf} - C_{Lo}) / (t_f - t_o) = (K_LaC^* - rx) - K_La / (t_f - t_o) \int_{t_o}^{t_f} C_Ldt \quad \text{——————} 19$$

จากสมการที่ 19 ถ้าเขียนกราฟระหว่าง $(C_{Lf} - C_{Lo}) / (t_f - t_o)$ เป็นแกนตั้ง กับ $\int_{t_o}^{t_f} C_L dt$ เป็นแกนนอน

จะได้ความชัน = $- K_L a / (t_f - t_o)$

กราฟตัดแกน Y = $(K_L a C^* - rx)$

เนื่องจากค่า $K_L a$ มีความสัมพันธ์กับค่า Parameter 2 ตัว คือ อัตราส่วนระหว่างกำลังต่อปริมาตรในถังหมัก (Pg / V) และ ค่าความเร็วของอากาศ (V_S) ซึ่งมีความสัมพันธ์ดังสมการที่ 15

$$K_L a = K (Pg / V)^{\alpha} (Vs)^{\beta} \qquad \text{——————15}$$

และเนื่องจากการทดลองไม่สามารถวัดค่า (Pg / V) ได้โดยตรง แต่เนื่องจากค่าอัตราส่วนระหว่างกำลังต่อปริมาตรในการหมักเปลี่ยนแปลงตามความเร็วรอบของการกวน ดังนั้นในการทดลองจะใช้ค่าความสัมพันธ์นี้ในการหาค่าคงที่ของ α และ β ดังสมการที่ 16

$$K_L a = K (n)^{\alpha} (Vs)^{\beta} \qquad \text{——————16}$$

เมื่อ n = ความเร็วรอบของการกวน (รอบต่อนาที)

โดยการเขียนกราฟระหว่างค่าสัมประสิทธิ์การส่งผ่านออกซิเจนเป็นแกนตั้ง กับ อัตราการกวนเมื่อให้อัตราการให้อากาศคงที่เป็นแกนนอน และเขียนกราฟระหว่างค่าสัมประสิทธิ์การส่งผ่านออกซิเจนเป็นแกนตั้ง กับ อัตราการให้อากาศเมื่อให้อัตราการกวนคงที่เป็นแกนนอน จากนั้นหาค่าความลาดเอียงของกราฟของความสัมพันธ์ทั้ง 2 ซึ่งจะได้ค่า Parameter α และ β ของถังหมักตามลำดับ

จากสมการที่ 16 เมื่อเราทราบค่า Parameter α และ β รวมถึงค่าสัมประสิทธิ์การส่งผ่านออกซิเจน ($K_L a$) แล้ว เราจึงสามารถหาค่า K ของถังหมักขนาด 5 ลิตร และ 12.5 ลิตรได้

ดังนั้นเมื่อกำหนดให้ค่าสัมประสิทธิ์ของการถ่ายเทออกซิเจนในถังหมักขนาด 12.5 ลิตร และ 5 ลิตร มีค่าเท่ากัน จะทำให้คำนวณความเร็วรอบของการกวนของถังหมักขนาด 12.5 ลิตร ได้จากสมการที่ 20

$$K_2 (n_2)^{\alpha_2} (V_{S2})^{\beta_2} = K_1 (n_1)^{\alpha_1} (V_{S1})^{\beta_1} \qquad \text{——————20}$$

แต่เนื่องจากในงานวิจัยไม่มีเครื่องมือวัดค่าการละลายของออกซิเจน (dissolved oxygen probe) ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงไม่สามารถทำการศึกษาเกณฑ์ทางกายภาพนี้ได้

ภาคผนวก จ

การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

1. สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์กรดมะนาว

สารละลายไทโอยูเรีย

ละลายโซเดียมเตตราบอเรต 2.0 กรัม ในสารละลายไทโอยูเรียความเข้มข้นร้อยละ 4 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร กรองสารละลายที่ได้ ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 9.2 เก็บไว้ในขวดสีชา

2. สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกลูโคส

สารละลายออโธ-ไดอะนิซิดีน(o-dianisidine)ความเข้มข้นร้อยละ1(น้ำหนักต่อปริมาตร)

ละลายออโธ-ไดอะนิซิดีน 1.0 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร

สารละลายพีจีโอ

ละลายพีจีโอเอนไซม์ 1 แคปซูล ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 โมลาร์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง 7 ปริมาตร 60 มิลลิลิตร เติมสารละลายออโธ-ไดอะนิซิดีนปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3. สารละลายสำหรับวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวส์

สารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิค (3,5-dinitrosalicylic acid)

ละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิค 1.0 กรัม ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 2 นอร์มอล ปริมาตร 20 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปริมาตร 50 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เติมโปตัสเซียมทาร์เตรต 30 กรัม นำไปอุ่นจนสารละลายหมด เติมน้ำกลั่นปริมาตรรวมเป็น 100 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีชา

ภาคผนวก ฉ

การย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์

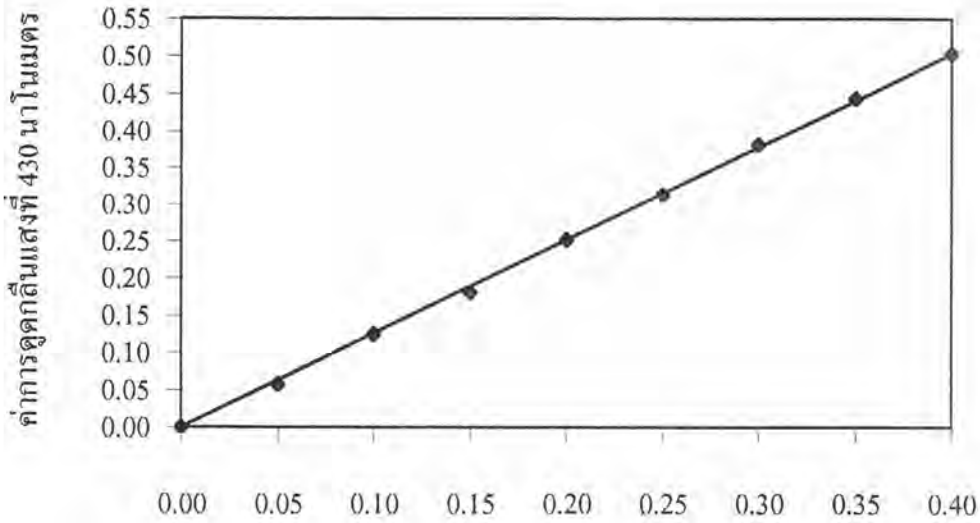
ขั้นตอนการย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์

1. ใส่แป้งมันสำปะหลัง 3.5 กิโลกรัม และน้ำกลั่น 7.5 ลิตร ในถังปฏิกรณ์ กวนให้เข้ากัน
2. ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 6.5 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มอล
3. เติมเอนไซม์ BAN 240L ปริมาตร 1.32 มิลลิลิตร
4. เพิ่มอุณหภูมิเป็น 90 องศาเซลเซียส แล้วลดอุณหภูมิลงทันทีและควบคุมไว้ที่ 60 องศาเซลเซียส
5. ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 4.3 ด้วยกรดซัลฟุริคความเข้มข้นร้อยละ 10
6. เติมเอนไซม์ AMG ปริมาตร 2.35 มิลลิลิตร
7. ควบคุมอุณหภูมิที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 ชั่วโมง
8. เพิ่มอุณหภูมิสูงขึ้นเป็น 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที
9. นำไปปั่นแยกตะกอนด้วยเครื่องปั่นแยก
10. เก็บในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส

ภาคผนวก ช

กราฟมาตรฐาน

กราฟมาตราฐานของกรดมะนาว โดยวิธีเพนตะโบรโมอะซิโตน

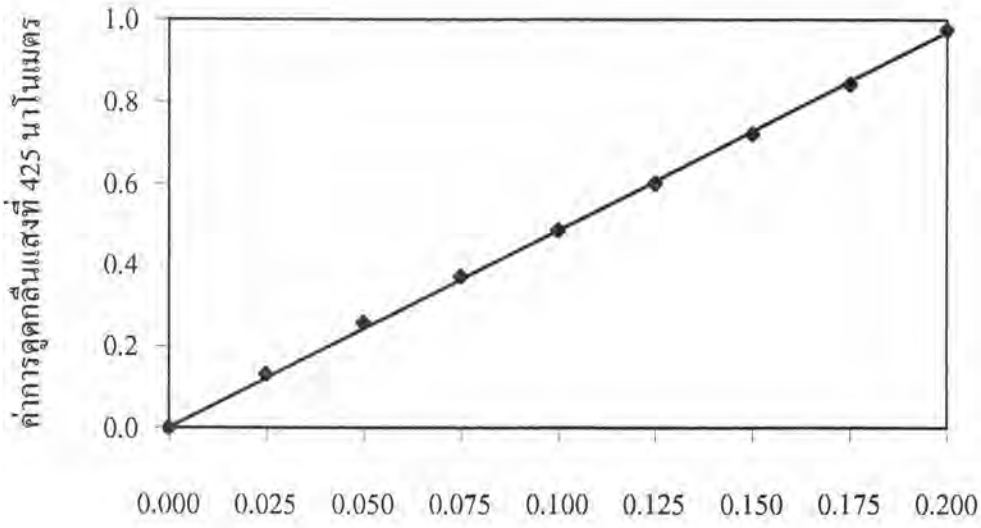


รูปที่ ช-1 กราฟมาตราฐานของกรดมะนาว

การคำนวณ

$$\text{กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงที่ 430 นาโนเมตร x ความเจือจาง}}{\text{ความชัน}}$$

กราฟมาตราฐานของน้ำตาลกลูโคส โดยการใช้ พีจีโอ เอนไซม์

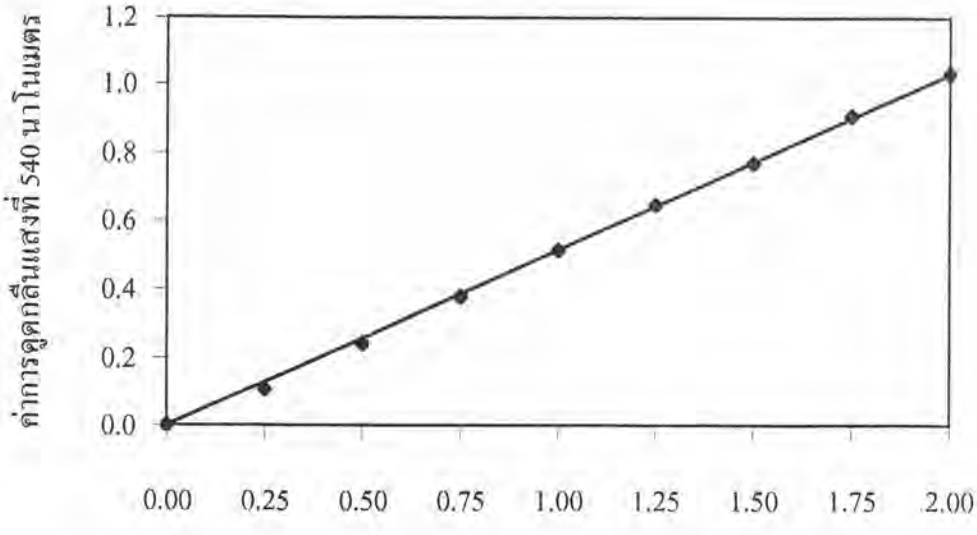


รูปที่ ช-2 กราฟมาตราฐานของน้ำตาลกลูโคส

การคำนวณ

$$\text{น้ำตาลกลูโคส (กรัมต่อลิตร)} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงที่ 425 นาโนเมตร x ความเจือจาง}}{\text{ความชัน}}$$

กราฟมาตราฐานของน้ำตาลรีดิวส์



รูปที่ ช-3 กราฟมาตราฐานของน้ำตาลรีดิวส์

การคำนวณ

$$\text{น้ำตาลรีดิวส์ (กรัมต่อลิตร)} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร x ความเจือจาง}}{\text{ความชัน}}$$

ภาคผนวก ซ

สูตรการคำนวณค่าทางจลนพลศาสตร์

1. อัตราการเจริญจำเพาะ (Specific growth rate; μ)

$$dx / dt = \mu x$$

$$\ln x_t = \ln x_0 + \mu t$$

เมื่อ x = ความเข้มข้นของเซลล์ (กรัมเซลล์แห้งต่อลิตร)

t = เวลา (ชั่วโมง)

μ = อัตราการเจริญจำเพาะ (ชั่วโมง$^{-1}$)

2. Productivity (P)

$$P = \text{ปริมาณผลผลิตกรดมะนาว / เวลาที่ใช้ในการหมัก}$$

$$= (p - p_0) / (t - t_0)$$

เมื่อ Productivity มีหน่วยเป็น กรัมกรดมะนาวต่อลิตรต่อชั่วโมง

3. Biomass yield ($Y_{X/S}$)

$$dx / dt = - Y_{X/S}\, ds / dt$$

$$Y_{X/S} = (x - x_0) / (s_0 - s)$$

เมื่อ $Y_{X/S}$ = ปริมาณเซลล์ต่อปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ใช้ (กรัมเซลล์แห้งต่อกรัมน้ำตาลกลูโคส)

s = ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส (กรัมน้ำตาลกลูโคสต่อลิตร)

4. Product yield ($Y_{p/S}$)

$$dp / dt = - Y_{p/S}\, ds / dt$$

$$Y_{p/S} = (p - p_0) / (s_0 - s)$$

เมื่อ $Y_{p/S}$ = ปริมาณผลผลิตกรดมะนาวต่อปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ใช้ (กรัมกรดมะนาวต่อกรัมน้ำตาลกลูโคส)

p = ปริมาณผลผลิตกรดมะนาว (กรัมกรดมะนาวต่อลิตร)

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายนริศ เหลืองวิไลวรรณ เกิดวันที่ 13 สิงหาคม 2517 ที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยในปีการศึกษา 2538 และเข้าศึกษาต่อในระดับบัณฑิตศึกษา หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปี 2539