รายการอ้างอิง

<u>ภาษาไทย</u>

ประเสริฐ หาญเมืองใจ.2537. <u>การผลิตกรดมะนาวจากแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยแล้วด้วยยีสต์ *Candida oleophila* C-73</u>. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีทางชีวภาพ จุฬาลงกรณ์มหวิทยาลัย.

ภรณี ลิมปิสุต. 2538. <u>การตรึงเซลล์ *CANDIDA OLEOPHILA* C-73 เพื่อผลิตกรดมะนาว</u>. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีทางชีวภาพ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ภาวิณี คณาสวัสดิ์. 2531. <u>การตรึงเอนไซม์และเซลล์</u> ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

เรวดี เลิศไตรรักษ์. 2535. <u>กรดมะนาวจากนอร์มัลพาราฟฟินส์โดยวิธีการหมักในอาหารเหลวด้วยยีสต์</u>. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีทางชีวภาพ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

วราวุฒิ ครูส่ง และรุ่งนภา พงศ์สวัสดิ์มานิต. 2530. การผลิตกรดซิตริค. <u>เทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม</u> หน้า 84-108 สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์ กรุงเทพมหานคร 10330

<u>ภาษาอังกฤษ</u>

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

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

Bochard,E.F. and Merrittt, E.G. 1979. Kirt-Othmer Encyclopedia of Chemical Technoloy, vol.3:149-150.

Briffaud,J. and Engasser,M. 1979. Citric acid production from glucose. II Growth and excretion kinetics in a trickleflow fermentor. Biotechnol. Bioeng. 21: 2093-2111.

Bucke,C. 1987. Cell immobilization in calcium alginate. In Mosbach,K. (ed.), New York: Acadamic Press. Method in Enzymology, Vol. 35, pp. 175-189.

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

Champagne, C-P., Girard,F. and Gardner,N. 1989. Growth of yeast contaminates in an immobilized lactic acid bacteria system. Letter. Appl. Microbiol. 8(6): 207-210.

Cheetham,P.S.J., Blunt,K.W. and Bucke,C.1980. Topics in enzyme and Fermentation Biotechnology. New York: Acadamic Press. Vol.4.

Chibata,I., Tosa,T. and Sato,T. 1974. Immobilized aspartase containing microbial cells : preparation and enzymatic properties. Appl. Microbiol. 27:878-885.

Chibata,Tosa,T.,Sato,T. and Mori,T. 1978. Immobilized Enzymes pp.1-147. New York: Halsted Press.

Chibata.,Tosa,T.,Sato,T. and Takata,I. 1987. Immobilization of cells in caragenan. In Mosback,K,(eds.), Method in Enzymology, New York: Acadamic Press. vol 135,pp.189-198.

Chibata.and Wingard,Jr.L.B. 1983. Immobilized Microbial cells. Applied Biochem and Bioeng, 9: pp. 1-4,54-99. New York: Acadamic Press.

Cheetham,P.S.J.,Blunt,K.W. and Bucke,C. 1979. Physical studies on cell immobilization using calcium alginate gels. Biotech and Bioeng.21:2155-2168.

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

Crueger, W. and Crueger, A. 1990. Organic acid. In Brock(eds.) In Biotechnology, a text book of industrial microbiology. 2nd ed. MA. Sinaverassociateds. 134-149.

Dawson , M.W., Maddox, Boss,I.F. and Brokes,J.D., 1988. Application of Fed-batch culture to citric acid production by *Aspergillus niger* . The effect of dilution rate dissolved oxygen tension. Biotechnol. Bioeng. 32:331-379.

Eikmeier,H. and Rehm,H-J. 1987. Stability of Calcium-alginate during citric acid production of immobilized *Aspergilus niger* . Appl. Microbial Biotechnol. 26:105-111.

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

Fukui, S. and tanaka,A. 1982. Immobilized microbial cells. Ann. Rev. Microbiol.36:356-363.

Furukawa,T., Matsuyoshi,T., Minoda,Y. and Yamada,K. 1977. Fermentation production of citric acid from n-paraffins by yeast. J. Ferment Technol. 55(4): 365-363.

Garg, K. and Sharma,C-B. 1992. Continuous production of citric acid by immobilizad whole cells of *Aspergillus niger.* J. Gen Appl. Microbiol. 36 : 6.5-615.

Grewal, H.S. and Kalra,K.L. 1995. Fungal production citric acid . Biotechnology Advances Vol.13 : 209-234.

Hamada,T., Sugishita,M. and Motai,H. 1990. Continuous of immobilized and free cell of salt-tolerant *Zygosaccharomyces rouxii* and *Candida vertilis* to the production of ethanol and 4-ethylguaiacal. Appl. Microbiol. Biotechnol.33: 624-628.

Hamamci,H. and Hang,Y.D. 1989. Production of citric acid by immobilized dried activated *Aspergillus niger*. Biotech tech.3(1): 51-54.

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

Hecker,D. Bisping,B. and Rehm,H-J. 1990. Continuous glycerol production by the Sulphite process with immobilized cells of *Saccharomyces cerevisiae*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 32(6):627-632

Hocnecker,s., Bisping,B., Yang,Z. and Rehm,H-J. 1989. Influence of sucrose concentration and phosphate limitation on citric acid production by immobilized cells of *Aspergillus niger*. Appl. Microbial. Biotechnol.31:17-24.

Horitsu,H., Adachi,S., Takahashi,Y., Kawai,K. and Kawano,Y. 1985. Production of citric acid by *Aspergilus niger* immobilized in polyacrylamide gels. Appl. Microbial Biotechnol. 22:8-12.

Horitsu,H., Takahashi,Y., Adachi,S., Xioa,R., Hayashi,T. and Kawai,K. 1988. Production of organic acid by immobilized cells of fungi. In Moo-Young,M.(ed.), Bioreactor

immobilized enzymes and cells: Fundamentals and application. pp. 287-300. New York: Elsevier Applied Science Publishes.

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

Kautola,H., Rymowicz., Linko,Y-Y. and Linko,P. 1991. Production of citric acid with immobilized *Yarrowia lipolytica*. Appl. Micribiol and Biotechnol. 35: 447-449.

Kim,E.K. and Roberts,R.S. 1991. Rate equation for the vigorous stationary phase fermentation of citric acid by *Saccharomycopsis lipolytica*. Biotech. And Bioeng. 37:785-788.

Klasson,T.K., Clausen,E.C. and Gaddy,J.L. 1989. Continuous fermentation for the production of citric acid from glucose. Appl. Biochem. Biotech. 20/21: 491- 509.

Klein,J., StocK,J. and Vorlop,K-d. 1983. Pore size and properties of spherical Ca-alginate biocatalysts. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 18: 86-91.

Koshcheenko,K.A. 1981. Living immobilized cells as biocatalysts of trasformation and biosynthesis of organic acid compounds. Appl. Microbiol. Biotechnol. 17: 351-365.

Kubicek,C.P. and Rohr,M. 1986. Citric acid fermentation. CRC Crit. Rev. Biotechnol. 3:331-373.

Lee,Y.H., Lee,C.W. and Chang,H.N. 1989. Citric acid production by *Aspergilus niger* immobilized on polyacrylamide foam. Appl. Microbial Biotechnol. 30:141-143.

Lockwood,L.B. and Schweiger,L.B. 1967. Citric acid aconitic acid production. In Pepplee,H.J.(ed.), Microbial Technology, pp. 183-199. New York :Reinholed.

Maddox,I. and Kingston,P. 1983. Use of immobilized cells of the yeast, *Saccharomycopsis lipolytica*, for the production of citric acid. Biotechnol Lett.5:795-798.

Maiorell, B.L.,Blanch,H.W. and Wilke, C.R. 1984. Feed component inhibition in ethanolic fermentation by *Saccharomyces cervisiae*. Biotechnol. Bioeng. 26;1155-1166.

Marchal,R., Chaude,O. and Metche,M.(1977) Production of citric acid from n-paraffins by *Saccharomycopsis lipolytica* : Kinetics and Balance of the Fermentation. European J. Appl. Microbiol. 4: 111-123

Marison,W. 1988. Citric acid production. In Seragg, A.H.(ed.), Biotechnology for engineers : Biological System in Technology Process, pp. 322-336. New York: John Wiley&Sons.

Matty,M. 1992. The production of citric acids. Crit. Rev. Biotechnol.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* IMK2 Appl. Microbial Biotechnol. 41:73-78.

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

Moresi , M., Cimarelli, D. Gasparrini, G. Liuzzo, G. and Marinelli, R. 1980. Kinetics of citric acid fermentation from n-paraffins by yeasts. J. Chem. Tech. Biotechnol. 30: 266-277.

Nakanishi,T., Yamamoto,M., Kimura,K. and Tanaka,K. 1972. Fermentation using immobilized yeast in fluidized bed reactor. J. Chem. Tech. Biotechnol. 55 ; 329-349.

Nilsson,K., Birnbaum,S., Flygare,S.,Linse,L. Schroder,U., Jeppsson,U.,Larsson,P-O., Mosbch,K. and Brodelius,P. 1983. A general method for the immobilization of cells with preserved viability. Appl. Microbial Biotechnol. 17:319-329.

Nguyen,V.T. and Shied,W.K. 1992. Continuous ethanol fermentation using immobilized yeast in a fluidized bed reactor. J. Chem. Tech. Biotechnol. 55:329-346.

Okoshi, H. Sato, S. and Takahashi, J. 1987. Citric acid production by *Candida tropicalis* under high dissoved oxygen concentration. Agric. Biol. Chem. 51;257-258.

Potvin,J., Desscrochers,M. and Acrand,Y.1988. Fermentation of kraft black liquor for the production of citric acid by *Candida tropicalis* . Appl. Microbiol. Biotechnol. 28:350-355.

Rane and Sims,K.A. 1993. Production of citric acid by *Candida lipolytica* Y1095: Effect of glucose concentration on yeild and productivity. Enzyme Microb. Technol, 15:646-656.

Rane,K-D. and Sims,K-A., 1994. Oxygen uptake and citric acid production by *Candida lipolytica* Y 1095. Biotechnol Bioeg 43:131-137

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

Rymowicz,W., Kautola,H.,Wojtowicz M., Linko,Y-Y. and Linko,P. 1993. Studies on citric acid production with immobilized *Yarrowia lipolytica* in repeated batch and contininuous air-life bioreactors. Appl. Microboil Biotechnol. 39: 1-4.

Scardi,V. 1987. Immobilization of enzymes and microbial cells in gelatin. In Mosbach,K.(ed.). Method in enzymology,. New York: Acadamic Press. Vol.135.pp293-299

Scragg, A.H.(ed.) 1991. Bioreactors in Biotechnology : A practical approach. Eliss horwood . England. pp.330.

Shah,D.N., Chattoo,B.B.,Baroda.,Kathari,R.M.,Patiala 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.

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

Wejtatowicz,M., Rymowicz,W. and Kautola, H. 1991. Coparison of different strains of the yeast *Yarrowia lipolytica* for citric acid production from glucose hydrol. Appl. Biochem. Biotechnol. 31: 165-174.

Xu, D.B., Maddrid, C.P., Rohr, M. and Kubicek, C.P. 1989. The influence of type and concentration of the carbon source on the production of citric acid by *Aspergillus niger* grown in submerged culture and on filter paper. Appl. Microbiol. Biotechnol. 30; 553-558.

ภาคผนวก ก

อาหารที่ใช้ในอาหารเลี้ยงยีสต์

อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการเจริญ (Yeast Malt Extract Medium)

อาหารเหลว

ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร ประกอบด้วย

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

ใส่อาหารเหลวสำหรับการเจริญเติบโต ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดทดลองขนาด 250 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

อาหารแข็ง (YM- slant)

อาหารแข็งลาดเอียงเตรียมได้โดยเติมวุ้นผง 20.0 กรัม ลงในอาหารเหลวสำหรับการเจริญเติบโต ปิเปตใส่ในหลอดทดลองหลอดละ 6.0 มิลลิลิตร ปิดจุกสำลีแล้วนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ เป็นเวลา 15 นาที

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อาหารสำหรับผลิตกรดมะนาว (ประเสริฐ, 2537) ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

ในอาหารเหลวสำหรับผลิตกรดมะนาว 1 ลิตร ประกอบด้วย

แป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์แล้ว		
มีน้ำตาลกลูโคส	200.0	กรัม
แอมโมเนียมคลอไรด์	2.0	กรัม
โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.2	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต	0.5	กรัม
แมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรต	0.2	กรัม
สารสกัดจากยีสต์	1.0	กรัม
แคลเซียมคาร์บอเนต	100	กรัม

ใส่อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดมะนาว ปริมาตร 3.5 ลิตรลงในถังขนาด 5 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

1. สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์กรดมะนาว

สารละลายไทโอยูเรีย

ละลายโซเดียมเตตราบอเรต 2.0 กรัม ในสารละลายไทโอยูเรียความเข้มข้นร้อยละ 4 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตรา 100.0 มิลลิลิตร กรองสารละที่ได้ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 9.2 เก็บไว้ในขวดสีชา

2. สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกลูโคส

สารละลายโอ-ไนอะนิซิดีน (o-diniasidine) ความเข้มข้นร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อปริมาตร)

ละลายโอ-ไนอะนิซิดีน 1.0 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 100.0 มิลลิลิตร

สารละลายพีจีโอ

ละลายพีจีโอเอนไซม์ 1 แคปซูล ในฟอสเฟตบัพเฟอร์ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 โมลาร์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง 7 ปริมาตร 60 มิลลิลิตร เติมสารละลายโอ-ไนอะนิซิดีนปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรด้วยฟอสเฟตบัพเฟอร์ เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3. สารละลายสำหรับวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์

สารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก (3,5-dinitrosalicylic acid)

ละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก 1.0 กรัม ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 2 นอร์มอล ปริมาตร 20.0 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปริมาตร 50.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันเติมโปตัสเซียมทาร์เตรต 30.0 กรัม นำไปอุ่นจนสารละลายหมดเติมน้ำกลั่นปริมาตรรวมเป็น 100.0 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีชา

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ค

การย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์

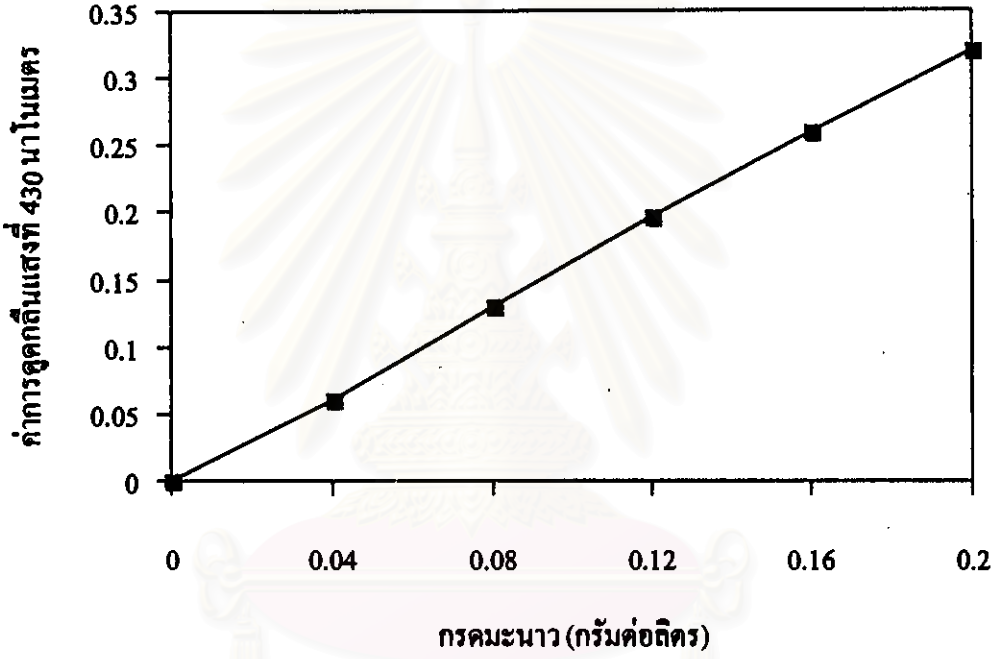
ขั้นตอนการย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์

1. ใส่แป้งมันสำปะหลัง 14 กิโลกรัมและน้ำกลั่น 30 ลิตรในถังปฏิกรณ์ กวนให้เข้ากัน
2. ปรับค่าความเป็นกรดด่างเป็น 6.5 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้ม 1 นอร์มอล
3. เติมเอนไซม์ BAN 240L ปริมาตร 5.25 มิลลิลิตร
4. เพิ่มอุณหภูมิเป็น 90 องศาเซลเซียส แล้วลดอุณหภูมิลงทันทีและควบคุมไว้ที่ 60 องศาเซลเซียส
5. ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 4.3 ด้วยกรดซัลฟุริกความเข้มข้นร้อยละ 10
6. เติมเอนไซม์ AMG ปริมาตร 8.5 มิลลิลิตร
7. ควบคุมอุณหภูมิที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 ชั่วโมง
8. เพิ่มอุณหภูมิสูงขึ้นเป็น 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที
9. นำไปปั่นแยกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง
10. เก็บในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

ภาคผนวก ง

กราฟมาตราฐาน

กราฟมาตราฐานของกรดมะนาว โดยวิธีเพนตะโบรโมอะซิโตน



รูปที่ 1 กราฟมาตราฐานของกรดมะนาว

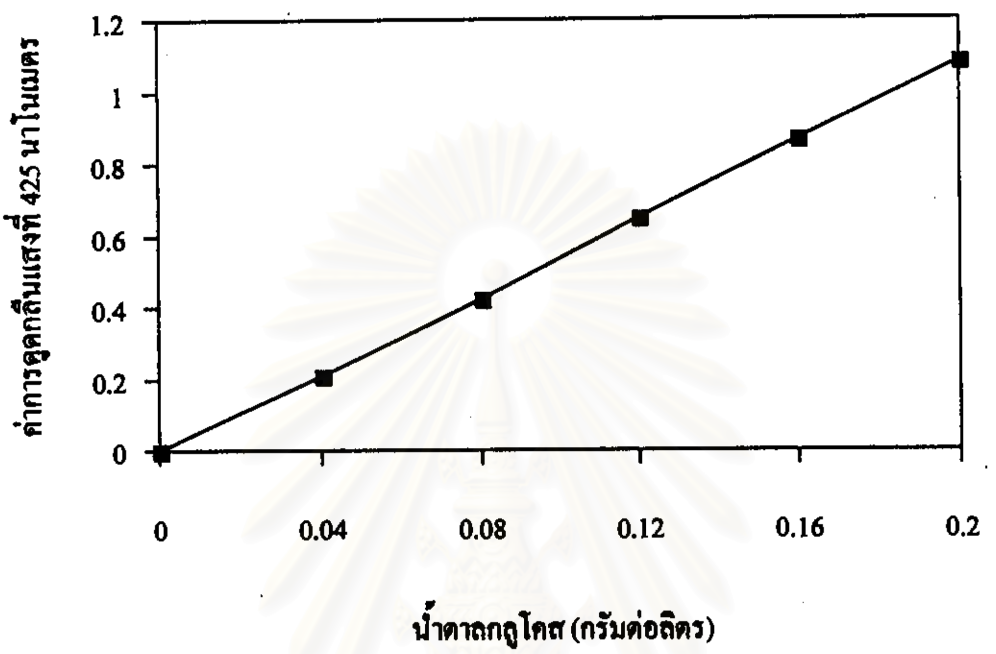
การคำนวณ

กรดมะนาว = <u>ค่าการดูดกลืนแสงที่ 430 นาโนเมตร X ความเจือจาง</u>

ความชัน

(กรัมต่อลิตร)

กราฟมาตราฐานของน้ำตาลกลูโคส โดยวิธีพีจีโอ เอนไซม์

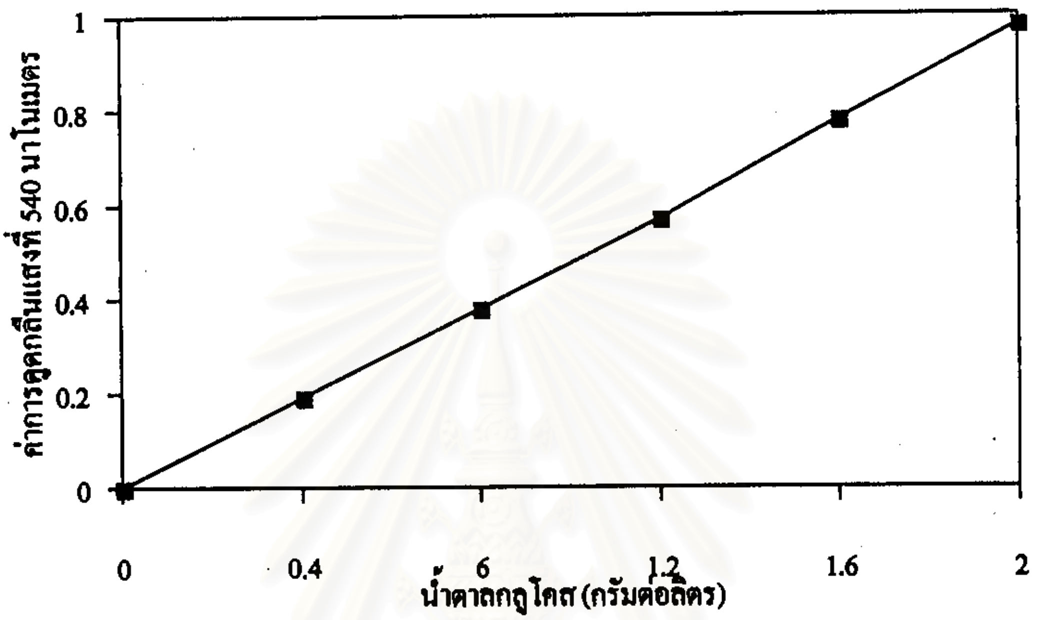


รูปที่ 2 กราฟมาตราฐานของน้ำตาลกลูโคส

การคำนวณ

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

กราฟมาตราฐานของน้ำตาลรีดิวซ์



รูปที่ 3 กราฟมาตราฐานของน้ำตาลรีดิวซ์

การคำนวณ

น้ำตาลรีดิวซ์ = <u>ค่าการดูดกลืนแสงที่ 430 นาโนเมตร X ความเจือจาง</u>

ความชัน

(กรัมต่อลิตร)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก จ

ข้อมูลการทดลอง

ตารางที่ 9ก. การผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 5 ลิตรจากเซลล์ตรึง *C. oleophila* C-73 โดยใช้เซลล์ตรึงเริ่มต้น 10กรัมเม็ดเซลล์ตรึงต่อลิตร หมักที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ควบคุมอัตราการกวน 300 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 vvm

เวลา (วัน)	ความเป็นกรด-ด่าง	ปริมาณกรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลกลูโคส (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ (กรัมต่อลิตร)
0	6.52	0.00	215.42	219.72
1	6.44	3.50	190.16	191.43
2	6.25	11.10	174.92	178.43
3	6.01	28.87	145.76	148.40
4	5.87	47.87	110.56	111.32
5	5.80	68.32	81.83	84.45
6	5.72	87.40	50.95	53.31
7	5.53	119.70	19.23	21.97
8	5.15	119.05	1.60	2.87

ตารางที่ 9ข. การผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 5 ลิตรจากเซลล์ตรึง *C. oleophila* C-73 โดยใช้เซลล์ตรึงเริ่มต้น 10กรัมเม็ดเซลล์ตรึงต่อลิตร หมักที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ควบคุมอัตราการกวน 400 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 vvm

เวลา (วัน)	ความเป็นกรด-ด่าง	ปริมาณกรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลกลูโคส (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ (กรัมต่อลิตร)
0	6.82	0.00	210.26	215.30
1	5.93	3.63	181.14	186.22
2	5.80	10.04	140.62	145.76
3	5.83	30.34	101.09	104.76
4	5.73	63.38	77.96	81.21
5	5.46	85.40	48.48	51.92
6	5.05	102.09	20.48	24.16
7	4.50	124.32	4.13	5.49
8	4.50	130.38	0.00	0.00

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 9ค. การผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 5 ลิตรจากเซลล์ตรึง *C. oleophila* C-73 โดยใช้เซลล์ตรึงเริ่มต้น 10กรัมเม็ดเซลล์ตรึงต่อลิตร หมักที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ควบคุมอัตราการกวน 500 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 vvm

เวลา (วัน)	ความเป็นกรด-ด่าง	ปริมาณกรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลกลูโคส (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ (กรัมต่อลิตร)
0	6.84	0.00	218.42	221.56
1	6.60	2.30	191.25	193.49
2	6.37	13.30	164.20	165.34
3	6.25	32.67	125.31	120.47
4	6.03	57.00	92.53	90.64
5	5.92	80.46	49.25	53.35
6	5.62	114.18	23.34	24.67
7	5.12	134.03	2.43	3.54
8	5.10	134.01	0.00	0.00

ตารางที่ 9ง. การผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 5 ลิตรจากเซลล์ตรึง *C. oleophila* C-73 โดยใช้เซลล์ตรึงเริ่มต้น 10กรัมเม็ดเซลล์ตรึงต่อลิตร หมักที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ควบคุมอัตราการกวน 600 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 vvm

เวลา (วัน)	ความเป็นกรด-ด่าง	ปริมาณกรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลกลูโคส (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ (กรัมต่อลิตร)
0	6.68	0.00	221.30	221.60
1	6.67	3.76	192.45	195.80
2	6.15	13.11	167.53	169.90
3	5.96	21.73	113.80	117.90
4	5.96	54.44	79.11	80.60
5	5.96	89.46	48.19	51.84
6	5.96	118.74	26.27	29.45
7	5.84	136.45	6.43	9.30
8	5.84	136.32	0.00	0.00

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 9ข. การผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 5 ลิตรจากเซลล์ตรึง *C. oleophila* C-73 โดยใช้เซลล์ตรึงเริ่มต้น 10 กรัมเม็ดเซลล์ตรึงต่อลิตร หมักที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ควบคุมอัตราการกวน 700 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 vvm

เวลา (วัน)	ความเป็นกรด-ด่าง	ปริมาณกรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลกลูโคส (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)
0	6.98	0.00	217.44	221.56
1	6.36	2.26	194.84	195.93
2	6.06	15.30	153.02	157.32
3	5.91	21.81	135.26	137.84
4	5.72	57.27	91.36	93.46
5	5.53	88.43	51.66	54.76
6	5.40	124.10	20.66	21.90
7	5.01	133.04	2.37	3.87
8	5.01	133.01	0.00	0.00

สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 10ก. การผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 5 ลิตรจากเซลล์ตรึง *C. oleophila* C-73 โดยใช้เซลล์ตรึงเริ่มต้น 15กรัมเม็ดเซลล์ตรึงต่อลิตร หมักที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ควบคุมอัตราการกวน 600 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 vvm

เวลา (วัน)	ความเป็นกรด-ด่าง	ปริมาณกรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลกลูโคส (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)
0	6.98	0.00	206.13	206.44
1	6.67	2.63	192.58	198.66
2	6.09	15.56	132.11	142.60
3	6.05	44.39	78.46	83.70
4	5.92	101.16	42.98	32.33
5	5.50	134.57	27.16	25.05
6	4.42	141.72	0.00	0.00

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 10ข. การผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 5 ลิตรจากเซลล์ตรึง *C. oleophila* C-73 โดยใช้เซลล์ตรึงเริ่มต้น 20กรัมเม็ดเซลล์ตรึงต่อลิตร หมักที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ควบคุมอัตราการกวน 600 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 vvm

เวลา (วัน)	ความเป็นกรด-ด่าง	ปริมาณกรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลกลูโคส (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)
0	6.96	0.00	207.66	202.34
1	6.15	6.39	176.66	180.71
2	6.01	33.98	130.69	141.29
3	5.77	64.87	95.42	98.53
4	5.24	102.21	60.23	52.02
5	4.98	135.21	23.10	28.43
6	4.98	138.23	0.00	0.00

ตารางที่ 11 การผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 5 ลิตรจากเซลล์ตรึง *C. oleophila* C-73 โดยกระบวนการหมักแบบ Fed-batchจำนวนเซลล์ตรึงเริ่มต้น 10 กรัมเซลล์ตรึงต่อลิตร หมักที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 vvm.

เวลา (ชั่วโมง)	ความเป็นกรด-ด่าง	ปริมาณกรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลกลูโคส (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ (กรัมต่อลิตร)
0	6.80	0.00	171.01	170.26
12	6.83	0.50	162.33	166.30
24	6.31	3.56	149.13	147.26
36	6.13	10.36	111.92	113.91
48	6.11	35.95	96.59	86.30
60	6.09	48.90	61.22	59.97
72	5.96	60.15	45.07	42.69
84	5.93	81.27	50.05	45.59
96	5.91	96.09	55.58	46.22
108	5.61	114.20	50.90	44.58
120	5.21	136.81	50.60	42.68

ตารางที่12 การผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 5 ลิตรจากเซลล์ตรึง *C. oleophila C-73* โดยใช้เซลล์ตรึงที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5-1.0 มิลลิเมตร จำนวนเซลล์ตรึงเริ่มต้น 15 กรัมเม็ดเซลล์ตรึงต่อลิตรหมักที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 vvm

เวลา (ชั่วโมง)	ความเป็นกรด-ด่าง	ปริมาณกรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลกลูโคส (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ (กรัมต่อลิตร)
0	6.46	0.00	203.05	204.00
12	6.05	3.13	182.73	180.37
24	6.17	13.25	167.20	165.35
36	5.92	41.52	135.46	132.78
48	5.88	58.23	118.21	100.24
60	5.80	71.06	79.98	87.67
72	5.73	99.04	58.38	59.04
84	4.25	120.78	28.7	39.36
96	3.92	134.09	5.12	8.53

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 13ก. การผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 5 ลิตรจากเซลล์ตรึง *C. oleophila C-73* จำนวนเซลล์ตรึงเริ่มต้น 15 กรัมเซลล์ตรึงต่อลิตร หมักที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 0.5 vvm

เวลา (ชั่วโมง)	ความเป็นกรด-ด่าง	ปริมาณกรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลกลูโคส (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)
0	6.51	0.00	218.13	219.46
12	5.98	0.20	190.94	188.65
24	5.96	2.87	146.34	145.37
36	6.01	14.69	122.47	125.60
48	5.94	39.72	91.53	83.40
60	5.75	48.20	62.18	61.19
72	5.40	71.41	48.17	50.70
84	5.30	98.89	30.99	34.17
96	5.23	118.67	4.08	5.94

ตารางที่ 13ข. การผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 5 ลิตรจากเซลล์ตรึง *C. oleophila C-73* จำนวนเซลล์ตรึงเริ่มต้น 15 กรัมเซลล์ตรึงต่อลิตร หมักที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm

เวลา (ชั่วโมง)	ความเป็นกรด-ด่าง	ปริมาณกรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลกลูโคส (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)
0	6.71	0.00	215.62	214.15
12	6.70	0.5	189.21	191.50
24	6.21	5.84	174.92	163.89
36	6.13	16.85	145.76	145.48
48	6.04	43.21	109.74	107.55
60	6.06	67.77	87.41	89.62
72	5.96	88.35	68.43	65.35
84	5.92	128.07	27.45	27.31
96	5.20	137.07	7.77	6.25

ตารางที่ 13 ค. การผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 5 ลิตรจากเซลล์ตรึง *C. oleophila* C-73 โดยใช้เซลล์ตรึงเริ่มต้น 15 กรัมเซลล์ตรึงต่อลิตร หมักที่อุณหภูมิ 28 เซลเซียส อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1.5 vvm

เวลา (ชั่วโมง)	ความเป็นกรด-ด่าง	ปริมาณกรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลกลูโคส (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ (กรัมต่อลิตร)
0	6.62	0.00	215.97	216.45
12	6.46	0.11	195.36	190.24
24	6.20	3.78	164.30	175.43
36	6.11	27.55	149.61	150.75
48	6.06	42.97	128.11	129.24
60	6.14	73.24	89.40	88.26
72	5.93	92.30	50.26	53.18
84	5.83	118.88	12.70	15.73
96	6.06	130.84	3.61	4.72

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ฉ

สูตรการคำนวณ

1. ผลผลิต (yeild)

$$\text{ผลผลิต(ร้อยละ)} = \frac{\text{กรดมะนาวที่ได้(กรัมต่อลิตร)X100}}{\text{น้ำตาลกลูโคสที่ใช้ไป}}$$

2. สมมูลเดกซ์โตรส (dextros equivalent ; DE) =

$$\frac{\text{น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร) X 100}}{\text{ปริมาณของแข็งทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)}}$$

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียน

นางสาว ธีรวัฒนา ภาระมาตย์ เกิดวันที่ 16 เมษายน 2509 ที่จังหวัดอำนาจเจริญ สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาชีววิทยา ภาควิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยรามคำแหง ในปีการศึกษา 2531 และเข้าศึกษาต่อในระดับบัณฑิตศึกษา หลักสูตรเทคโนโลยีทางชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปี 2537

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย