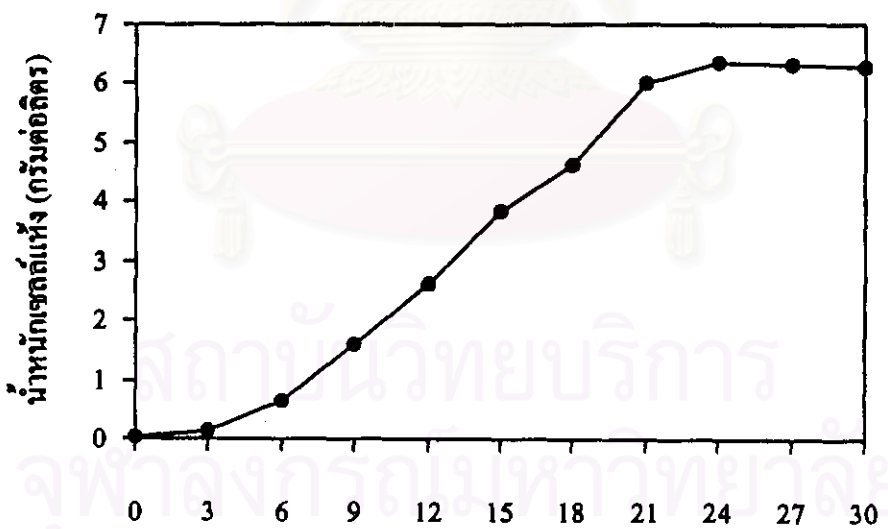
บทที่ 3

ผลการทดลอง

3.1 การศึกษาลักษณะการเจริญของ *C. oleophila C-73* ในอาหารเหลวสำหรับการเจริญเติบโต

ศึกษาการเจริญของยีสต์ *C. oleophila C-73* โดยทำการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว (YM-medium) ตามวิธีการทดลองในข้อ 2.2.4 ควบคุมอุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส บ่มบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุก 3 ชั่วโมง ติดตามการเจริญโดยหาน้ำหนักแห้งของเซลล์ตามวิธีข้อ 2.2.9.1 ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 3



รูปที่ 3 การเจริญของ *C. oleophila* C-73 ในอาหารเหลว Yeast Malt Extract ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที

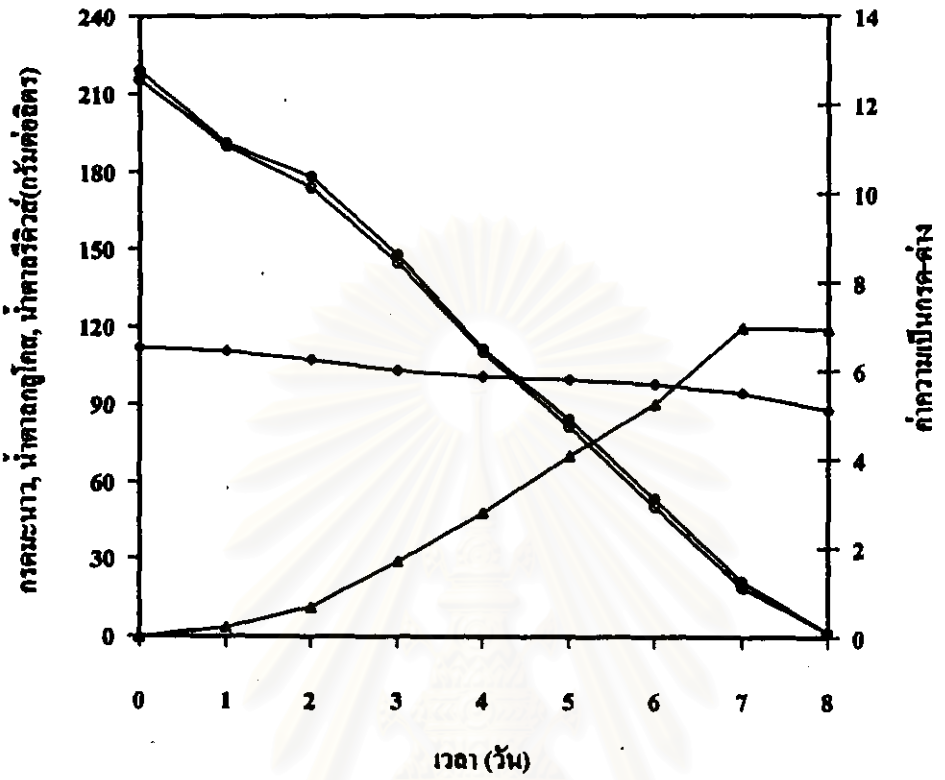
พบว่า การเจริญของเชื้อเริ่มเข้าสู่การเจริญในระยะทวีคูณ (Logarithmic phase) ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 3 จนถึงชั่วโมงที่ 21 และเข้าสู่ระยะคงที่ (Stationary phase) ในชั่วโมงที่ 21 ถึงชั่วโมงที่ 30 การทดลองจึงเลือกใช้ช่วงเวลาของการเจริญในช่วงกลางของระยะทวีคูณ (Mid-logarithmic phase) คือชั่วโมงที่ 15 นำเซลล์ไปทำการตรึงเซลล์ และนำไปผลิตกรดมะนาวต่อไป

3.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดมะนาวจากเซลล์ตรึง *C. olephila C-73* ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

3.2.1 ผลของอัตราการกวนอาหารเลี้ยงเชื้อ

การศึกษาการผลิตกรดมะนาวจากเซลล์ตรึง *C. oleophila* C-73 ในระดับขวดเขย่าของภรณี ลิมปิสุต (2538) ได้ใช้ความเร็วรอบการเขย่า 300 รอบต่อนาที ปริมาณเซลล์ตรึงเริ่มต้น10 กรัมเม็ดเซลล์ตรึงต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อ ให้ผลผลิตกรดมะนาวเป็นที่น่าพอใจ ในการผลิตกรดมะนาวจากเซลล์ตรึง *C. oleophila* C-73 ในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร จึงจำเป็นต้องศึกษาหาอัตราการกวนของใบพัดในถังหมักที่เหมาะสม งานวิจัยนี้ได้ทำการแปรผันอัตราการกวนสารอาหารในช่วง 300-700 รอบต่อนาที ใช้จำนวนเซลล์ตรึงเริ่มต้น 10 กรัมเม็ดเซลล์ตรึงต่อลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตกรดมะนาว มีปริมาณน้ำตาลกลูโคสได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์ 200 กรัมต่อลิตร(ภาคผนวก ก) อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส อัตราการให้อากาศ 1 vvm. เก็บตัวอย่างเพื่อมาวิเคราะห์ทุก 24 ชั่วโมง

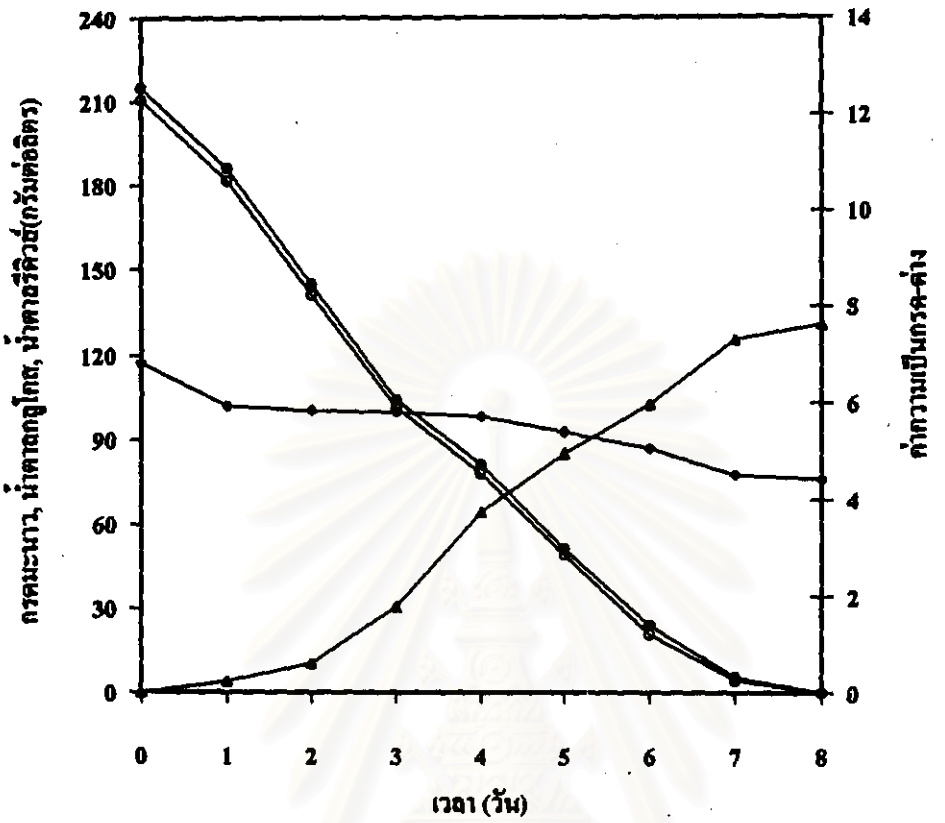
ผลการทดลองเมื่อควบคุมอัตราการกวน 300 รอบต่อนาที แสดงในรูปที่ 4 ก. อัตราการผลิตกรดมะนาวประมาณ 22.71 กรัมต่อลิตรต่อวัน ผลผลิตกรดมะนาวสูงสุดเท่ากับ 119.70 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 7 ของการหมัก



รูปที่ 4ก. แสดงผลการผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยเซลล์ตรึง *C. oleophila* C-73 จำนวนเซลล์ตรึงเริ่มต้น 10 กรัมเม็ดเซลล์ตรึงต่อลิตร ควบคุมการหมักที่ 28 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 300 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 vvm

▲ กรดมะนาว ○ น้ำตาลกลูโคส
● น้ำตาลรีดิวซ์ ◆ ค่าความเป็นกรดด่าง

เมื่อเพิ่มความเร็วรอบในการกวนอาหารเป็น 400 รอบต่อนาที ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 4ข อัตราการผลิตกรดมะนาวเพิ่มมากขึ้นเป็น 23.88 กรัมต่อลิตรต่อวัน ผลผลิตกรดมะนาวสูงสุดเท่ากับ 130.38 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 7 ของการหมัก ค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำหมักลดลงเล็กน้อย

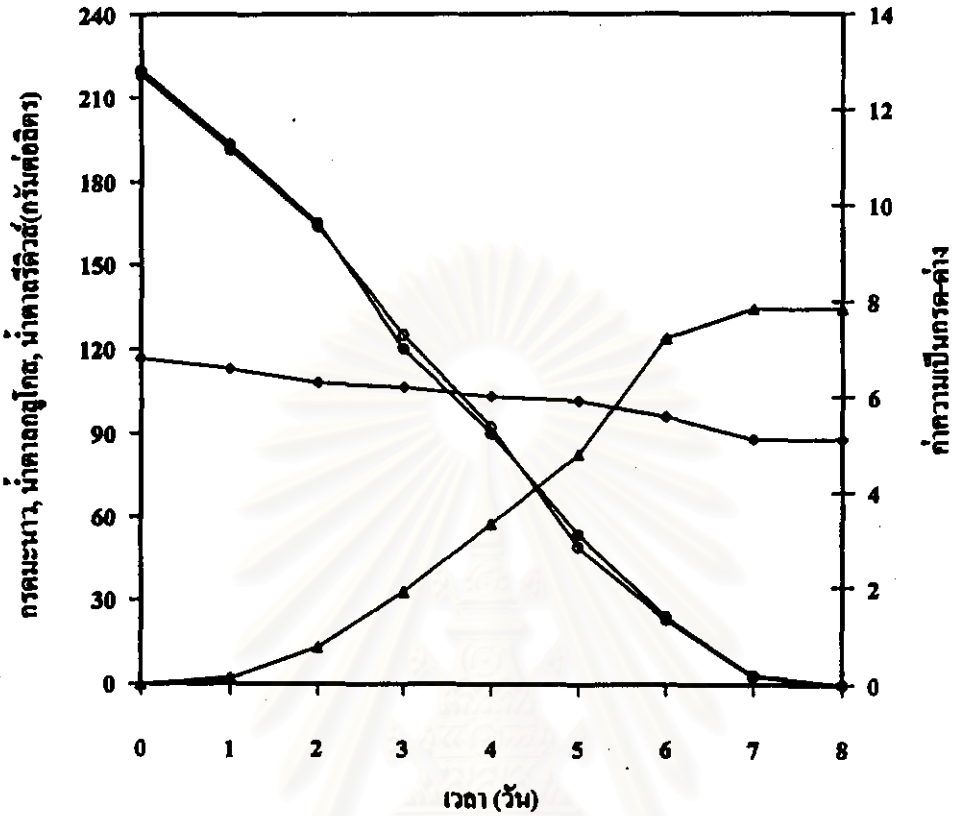


รูปที่ 4ข. แสดงผลการผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยเซลล์ตรึง *C. oleophila* C-73 จำนวนเซลล์ตรึงเริ่มต้น 10 กรัมเม็ดเซลล์ตรึงต่อลิตร ควบคุมการหมักที่ 28 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 400 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 vvm

▲ กรดมะนาว ○ น้ำตาลกลูโคส

● น้ำตาลรีดิวซ์ ◆ ค่าความเป็นกรดด่าง

เมื่อเพิ่มอัตราการกวนอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 500 รอบต่อนาที ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 4ค พบว่าอัตราการผลิตกรดมะนาวเพิ่มมากขึ้นเป็น 30.44 กรัมต่อลิตรต่อวัน ปริมาณกรดมะนาวสูงสุดเท่ากับ 134.03 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 7 ของการหมัก

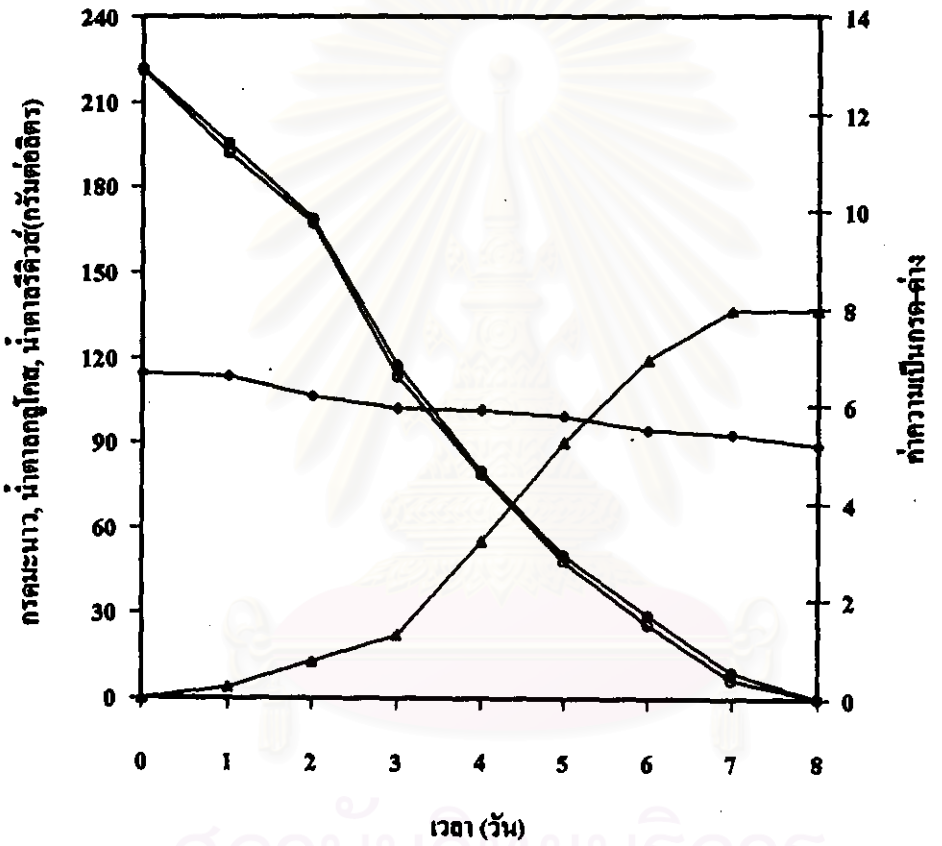


รูปที่ 4ค. แสดงผลการผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยเซลล์ตรึง *C. oleophila* C-73 จำนวนเซลล์ตรึงเริ่มต้น 10 กรัมเม็ดเซลล์ตรึงต่อลิตร ควบคุมการหมักที่ 28 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 500 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 vvm.

▲ กรดมะนาว o น้ำตาลกลูโคส
● น้ำตาลรีดิวซ์ ◆ ค่าความเป็นกรดด่าง

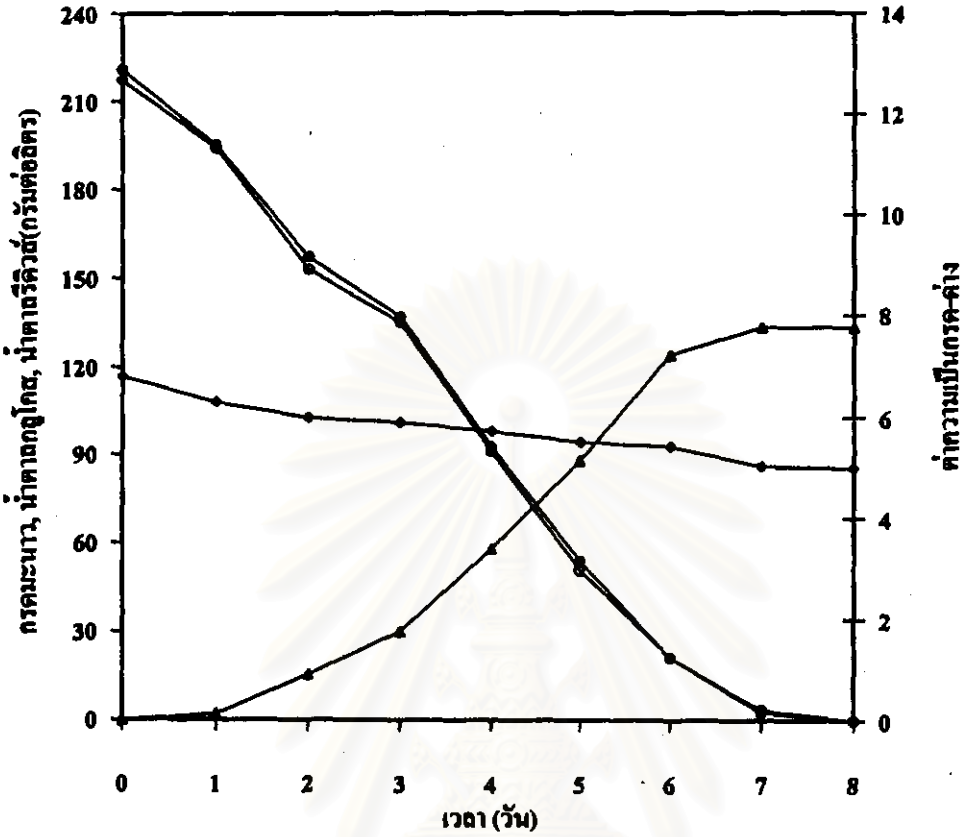
เมื่อเพิ่มอัตราการกวนอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 600 รอบต่อนาที ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 4ง อัตราการผลิตกรดมะนาวประมาณ 34 กรัมต่อลิตรต่อวัน ปริมาณการผลิตกรดมะนาวสูงสุดเท่ากับ 136.45 กรัมต่อลิตรในวันที่ 7 ของการหมัก แต่เมื่อทำการเพิ่มอัตราการกวนอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 700 รอบต่อนาที ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 4จ พบว่าอัตราการผลิตกรดมะนาวประมาณ 34 กรัมต่อลิตรต่อวัน ปริมาณกรดมะนาวสูงสุดเท่ากับ 133.04 กรัมต่อลิตรในวันที่ 7 ของการหมัก เปรียบเทียบ

ผล แสดงในรูปที่ 4 ฉ พบว่าอัตราการการอาหารเลี้ยงเชื้อ 600 รอบต่อนาที ให้ผลผลิตกรดมะนาวสูงสุด เมื่อคิดผลผลิตกรดมะนาว ที่ได้จากปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ใช้ไปเท่ากับ 61.03, 61.83, 62.05, 63.50 และ 61.86 ตามลำดับ ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงเลือกใช้อัตราการกวน 600 ตอบต่อนาที ในการผลิตกรดมะนาวจากเซลล์ตรึง *C. oleophila* C-73



รูปที่ 4ง. แสดงผลการผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยเซลล์ตรึง *C. oleophila* C-73 จำนวนเซลล์ตรึงเริ่มต้น 10 กรัมเมื่อเซลล์ตรึงต่อลิตร ควบคุมการหมักที่ 28 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 vvm.

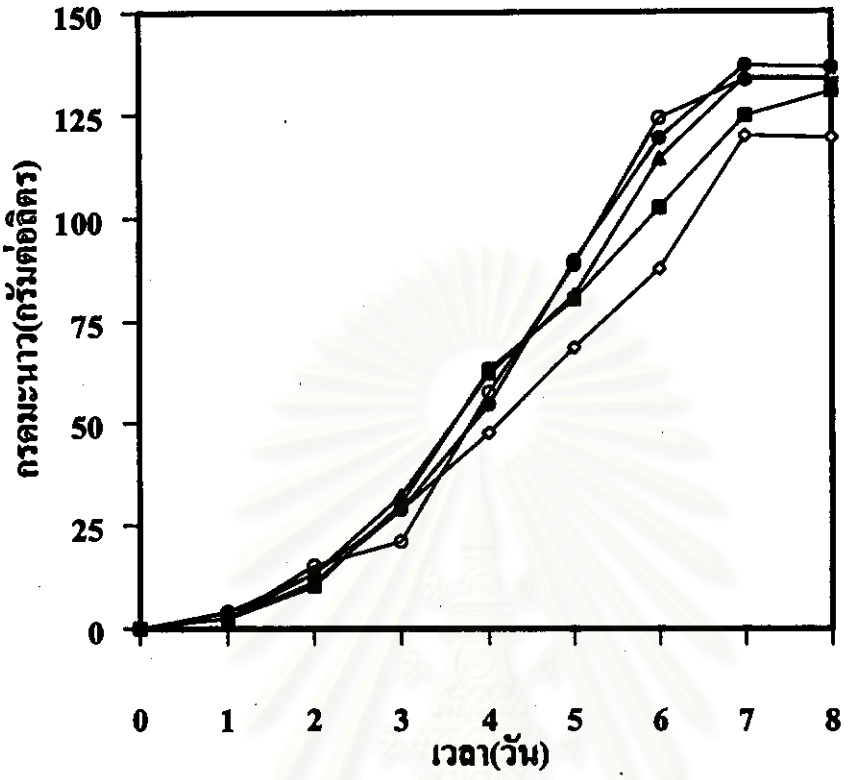
▲ กรดมะนาว ○ น้ำตาลกลูโคส
● น้ำตาลรีดิวซ์ ◆ ค่าความเป็นกรดด่าง



รูปที่ 40. แสดงผลการผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยเซลล์ตรึง *C. oleophila* C-73 จำนวนเซลล์ตรึงเริ่มต้น 10 กรัมเม็ดเซลล์ตรึงต่อลิตร ควบคุมการหมักที่ 28 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 700 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 vvm.

▲ กรดมะนาว ○ น้ำตาลกลูโคส
● น้ำตาลรีดิวซ์ ◆ ค่าความเป็นกรดด่าง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

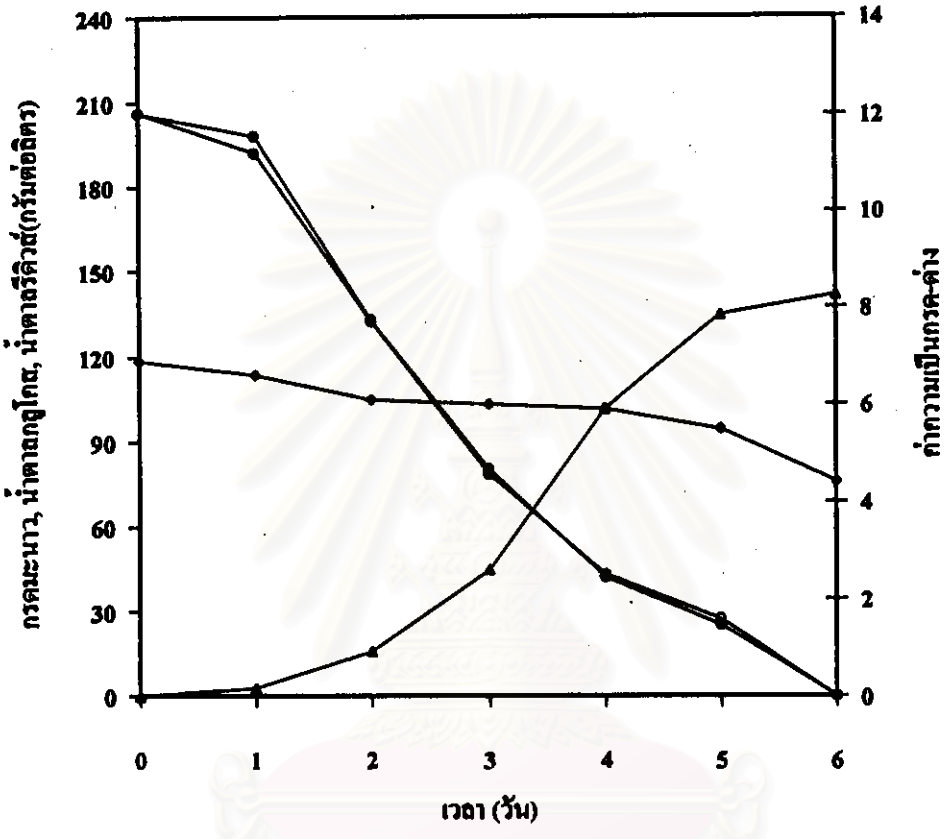


รูปที่ 4ฉ. แสดงเปรียบเทียบผลการผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 5 ลิตรจากเชลล์ตรึง *C. oleophila* C-73 โดยการแปรผันอัตราการกวน 300, 400, 500, 600 และ 700 รอบต่อนาที จำนวนเชลล์ตรึงเริ่มต้น 10 กรัมเม็ดเชลล์ตรึงต่อลิตร ควบคุมการหมักที่ 28 องศาเซลเซียส อัตราการให้อากาศ 1 vvm.

- ◇ 300 รอบต่อนาที
- ◆ 400 รอบต่อนาที
- ▲ 500 รอบต่อนาที
- ● 600 รอบต่อนาที
- ○ 700 รอบต่อนาที

2.2 ปริมาณเซลล์ตรึงเริ่มต้นที่เหมาะสม

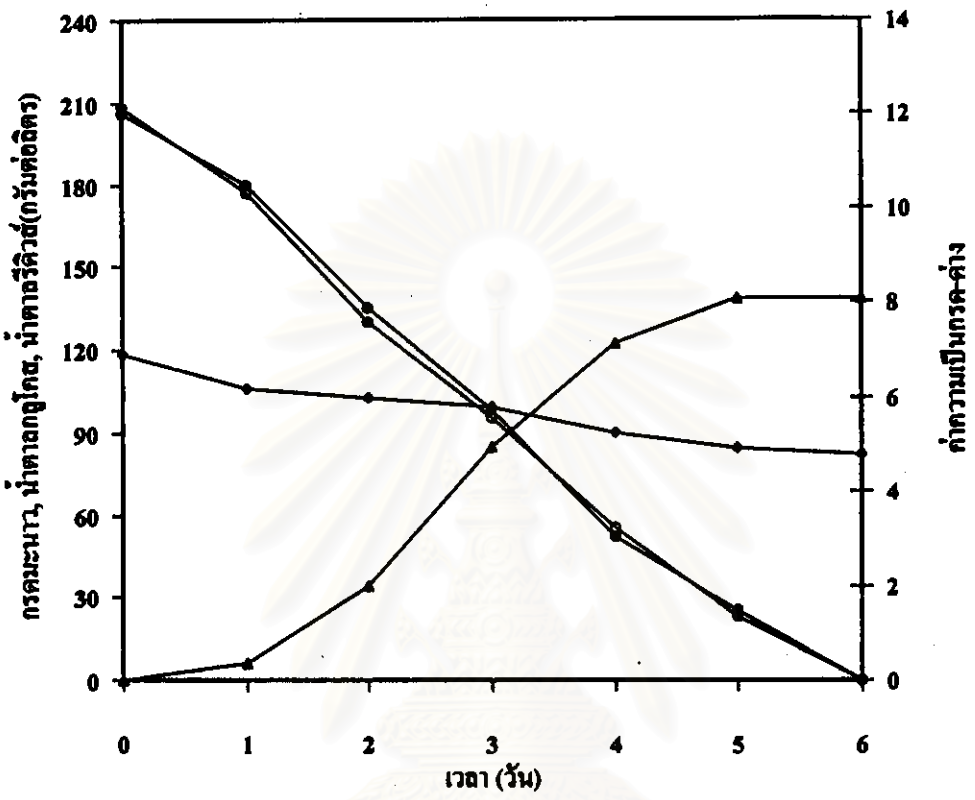
การผันปริมาณเซลล์ตรึงเริ่มต้นเพื่อให้เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 5 ลิตร ทำการแปรผันปริมาณเซลล์ตรึงเริ่มต้นเป็น 0.4, 0.6, 0.8 กรัมต่อลิตรหรือคิดเป็น 10, 15, 20 กรัมเม็ดเซลล์ตรึงต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อตามลำดับ หมักเซลล์ตรึงในในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 5 ลิตร ควบคุมการหมักที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 vvm. เก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง ผลการทดลองเมื่อใช้ปริมาณเซลล์ตรึงเริ่มต้น 10 กรัมเม็ดเซลล์ตรึงต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อแสดงในรูปที่ 4ง. ผลผลิตกรดมะนาวสูงสุดเท่ากับ 136.45 กรัมต่อลิตรในวันที่ 7 ของการหมัก เมื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ตรึงเริ่มต้น 15 กรัมต่อลิตร หรือจำนวนเซลล์ 0.6 กรัมต่อลิตร ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 5 ก. ให้ผลผลิตกรดมะนาวสูงสุดเท่ากับ 141.72 กรัมต่อลิตรในวันที่ 6 ของการหมัก อัตราการผลิตกรดมะนาวได้เท่ากับ 45 กรัมต่อลิตรต่อวัน และเมื่อเพิ่มปริมาณเซลล์ตรึงเริ่มต้นเป็น 20 กรัมเม็ดเซลล์ตรึงต่อลิตร หรือปริมาณเซลล์ 0.8 กรัมต่อลิตร ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 5 ข. ให้ผลผลิตกรดมะนาวสูงสุดเท่ากับ 138.23 กรัมต่อลิตรในวันที่ 6 ของการหมัก และอัตราการผลิตกรดมะนาวเท่ากับ 44 กรัมต่อลิตรต่อวัน เปรียบเทียบผลผลิตกรดมะนาวที่เมื่อใช้ปริมาณเซลล์ตรึงเริ่มต้น 10,15, 20 กรัมเม็ดเซลล์ตรึงต่อลิตรแสดงดังรูปที่ 5ค. พบว่าเมื่อใช้ปริมาณเซลล์ตรึงเริ่มต้น 15 กรัมเม็ดเซลล์ตรึงต่อลิตร จะให้ผลผลิตกรดมะนาวสูงสุด ผลผลิตกรดมะนาวที่ได้เปรียบเทียบจากปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ถูกใช้ไปเท่ากับ 63.50, 68.75 และ 66.56 ตามลำดับ ดังนั้นปริมาณเซลล์ตรึงเริ่มต้น 15 กรัมเม็ดเซลล์ตรึงต่อลิตรจึงเหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาวจากเซลล์ตรึง *C. oleophila C-73* ในถังหมักขนาด 5 ลิตร



รูปที่ 5ก. แสดงผลการผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 5 ลิตรจากเซลล์ตรึง *C. oleophila* C-73 โดยใช้จำนวนเซลล์ตรึงเริ่มต้น 15 กรัมเม็ดเซลล์ตรึงต่อลิตร ควบคุมการหมักที่ 28 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 vvm.

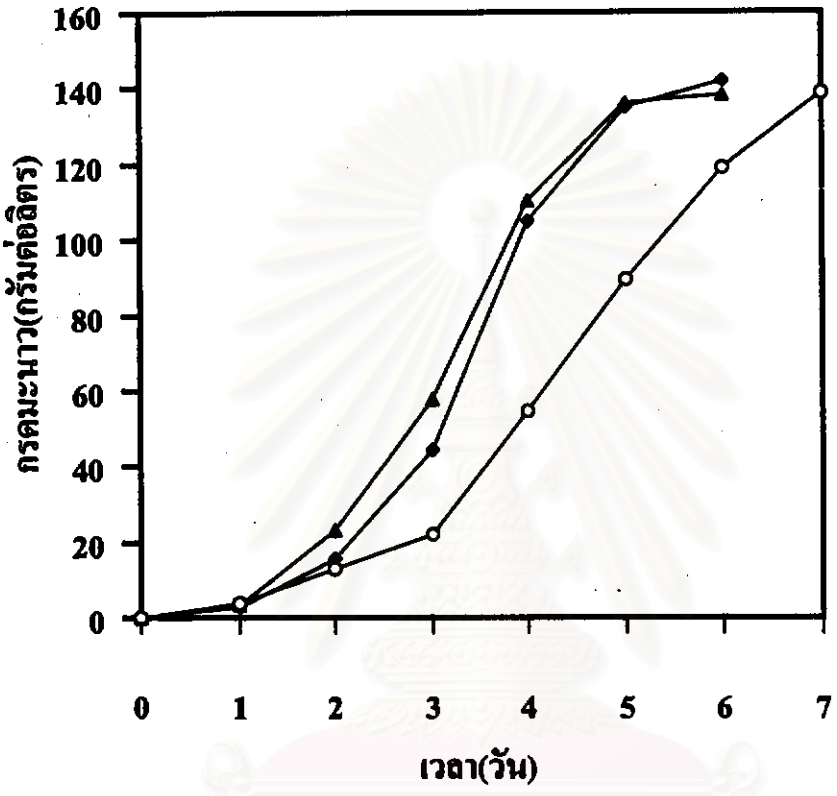
▲ กรดมะนาว ○ น้ำตาลกลูโคส

● น้ำตาลรีดิวซ์ ◆ ค่าความเป็นกรดด่าง



รูปที่ 5ข. แสดงผลการผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 5 ลิตรจากเซลล์ตรึง *C. oleophila* C-73 โดยใช้จำนวนเซลล์ตรึงเริ่มต้น 20 กรัมเม็ดเซลล์ตรึงต่อลิตร หมักที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 vvm.

▲ กรดมะนาว ○ น้ำตาลกลูโคส
● น้ำตาลรีดิวซ์ ◆ ค่าความเป็นกรดด่าง



รูปที่ 5ค. เปรียบเทียบการผลการผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 5 ลิตรจากเซลล์ตรึง *C. oleophila* C-73 โดยใช้จำนวนเซลล์ตรึงเริ่มต้น 10, 15 และ 20 กรัมเม็ดเซลล์ตรึงต่อลิตร ควบคุมการหมักที่ 28 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 vvm.

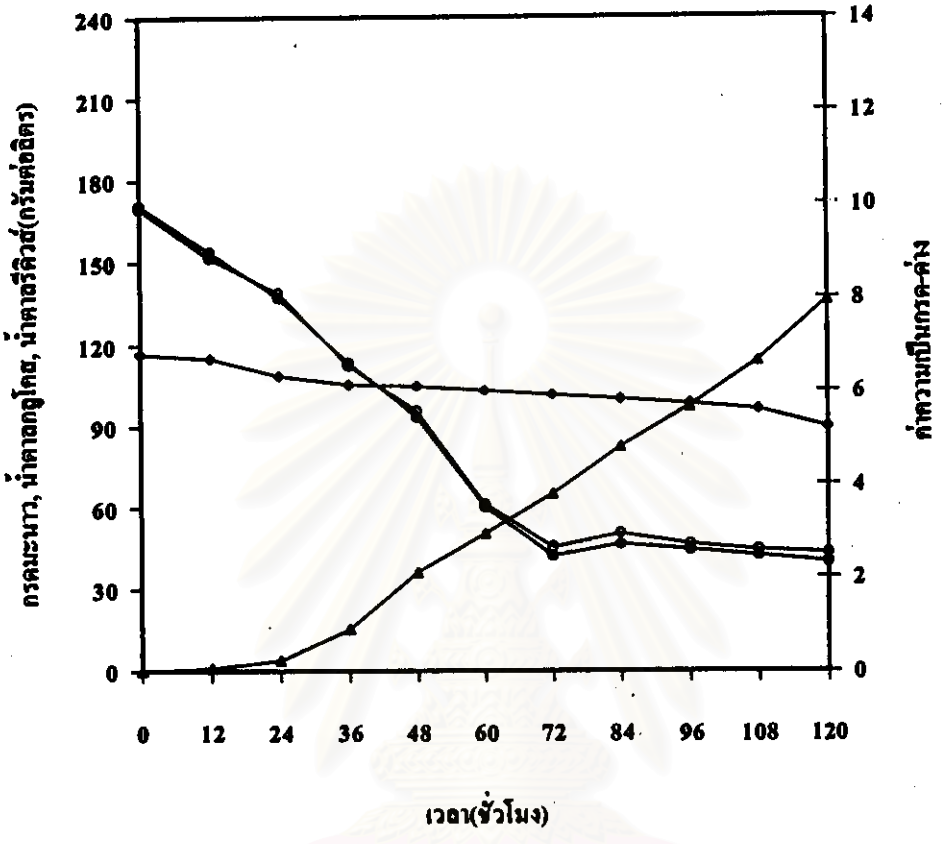
- ○ 10 กรัมเม็ดเซลล์ตรึงต่อลิตร
- ◆ 15 กรัมเม็ดเซลล์ตรึงต่อลิตร
- ▲ 20 กรัมเม็ดเซลล์ตรึงต่อลิตร

3.2.3 ผลของกระบวนการหมักแบบ Fed-batch fermentation

จากการผลิตกรดมะนาวจาก *C. oleophila C-73* จะต้องใช้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นสูงประมาณ คือ 200-220 กรัมต่อลิตร จึงจะให้ผลผลิตสูงสุด ซึ่งปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นที่สูงมาก ๆ นี้จะมีผลทำให้อัตราการเจริญต่ำและอัตราการผลิตกรดมะนาวช้าลง ดังนั้นจึงทำการแบ่งเติมกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งด้วยเอนไซม์เข้าไปในถังหมัก ระยะเวลาที่เติมแป้งที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์โดยเริ่มเติมน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งด้วยเอนไซม์ในชั่วโมงที่ 48 ปริมาตร 0.50 ลิตร ในอัตรา 4.0 กรัมต่อชั่วโมง โดยมีปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตกรดมะนาวเริ่มต้น 3.0 ลิตร จำนวนเซลล์ตรึงเริ่มต้น 10 กรัมเซลล์ตรึงต่อลิตร ทำการหมักที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 vvm. ทำการเก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง

ผลการทดลองที่ได้แสดงในรูปที่ 6 พบว่าอัตราการเจริญเติบโตเพิ่มมากขึ้น อัตราการผลิตกรดมะนาวเร็วขึ้นกว่าการผลิตกรดมะนาวโดยกระบวนการหมักแบบ Batch อัตราการผลิตกรดมะนาวประมาณ 1.36 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง หรือเท่ากับ 32.65 กรัมต่อลิตรต่อวัน ผลผลิตกรดมะนาวสูงสุดเท่ากับ 136.81 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 5 ของการหมัก ดังนั้นการแบ่งเติมปริมาณน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นจึงเหมาะสำหรับการผลิตกรดมะนาวจากเซลล์ตรึง *C. oleophila* C-73 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร อีกทั้งเป็นการลดปัญหาการเกิดความหนืดสูง ของน้ำหมัก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 6. แสดงผลการผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 5 ลิตรจากเชลล์ตรึง *C. oleophila* C-73 โดยใช้กระบวนการหมักแบบ Fed-batch fermentationจำนวนเชลล์ตรึงเริ่มต้น 10 กรัมเม็ดเชลล์ตรึงต่อลิตร ควบคุมการหมักที่ 28 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 vvm.

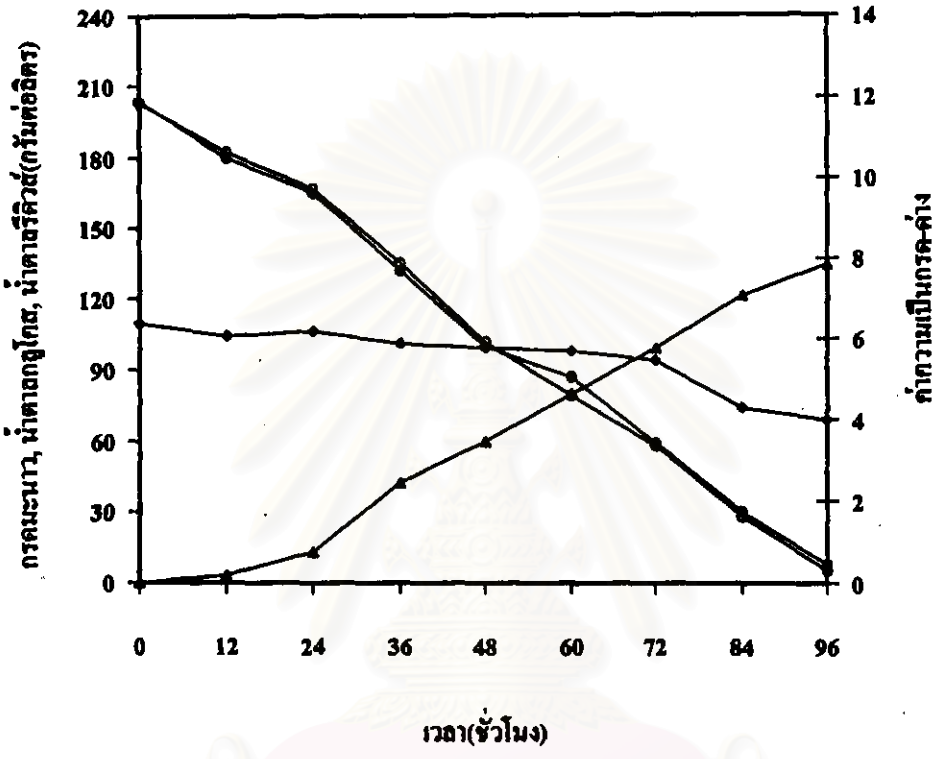
⬇ เวลาที่เริ่มเติมน้ำตาลกลูโคส

▲ กรดมะนาว　　o น้ำตาลกลูโคส

● น้ำตาลรีดิวซ์　　◆ ค่าความเป็นกรดด่าง

3.2.4 ผลของการผลิตกรดมะนาวโดยใช้เซลล์ตรึงที่มีขนาดเล็ก

Horitsu และคณะ (1988) และ Kautola และคณะ (1993) พบว่าเซลล์ตรึงที่ขนาดเล็กจะสามารถผลิตกรดมะนาวได้สูงกว่าเซลล์ตรึงที่มีขนาดใหญ่ ดังนั้นการทดลองนี้จึงทำการเปลี่ยนวิธีการตรึงเซลล์ตามวิธีในข้อ 2.2.5.2 เป็นการตรึงเซลล์โดยผสมเซลล์ยีสกับสารละลายโซเดียมอัลจิเนต แล้วผสมลงในมันถั่วเหลืองที่ผ่านการฆ่าเชื้อเป็นสารตัวกลางในการตรึงเซลล์ ปั่นด้วยเครื่องกวนความเร็ว 600 รอบต่อนาทีจนกระทั่งเม็ดเจลมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5-1.0 มิลลิเมตร จึงเทสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.25 โมลาร์ลงอย่างรวดเร็วและเพิ่มความเร็วรอบในการกวนเป็น 1,000 รอบต่อนาที ประมาณ 5 นาที จากนั้นจึงกวนเบาๆ ทิ้งทิ้งไว้ประมาณ 1 ชั่วโมง ล้างเซลล์ตรึงด้วยสารละลายแคลเซียมคลอไรด์เข้มข้น 0.25 โมลาร์และน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เมื่อนำไปวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของเซลล์ตรึงพบว่าเซลล์ตรึงที่ได้จะมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.5-1.0 มิลลิเมตร ใช้ระยะเวลาในการตรึงเซลล์สั้นเมื่อนำเอาเซลล์ตรึงที่ได้จำนวน 15 กรัมเซลล์ตรึงต่อลิตรไปผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 5 ลิตร ควบคุมการหมักที่อุณหภูมิ 28 เซลเซียส อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 vvm. เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 7 ปริมาณการผลิตกรดมะนาวมีค่าใกล้เคียงกันคือ 134.09 กรัมต่อลิตร แต่ระยะเวลาในการผลิตกรดมะนาวเร็วขึ้นคือในชั่วโมงที่ 96 ของการหมัก อัตราการผลิตกรดมะนาวเท่ากับ 1.65 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงใช้เซลล์ตรึงที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5-1.0 มิลลิเมตร เนื่องจากเซลล์ตรึงมีขนาดเล็กเซลล์ตรึงมีพื้นที่ผิวสัมผัสอาหารและอากาศมากขึ้น ทำให้อัตราการผลิตกรดมะนาวได้เร็วขึ้น



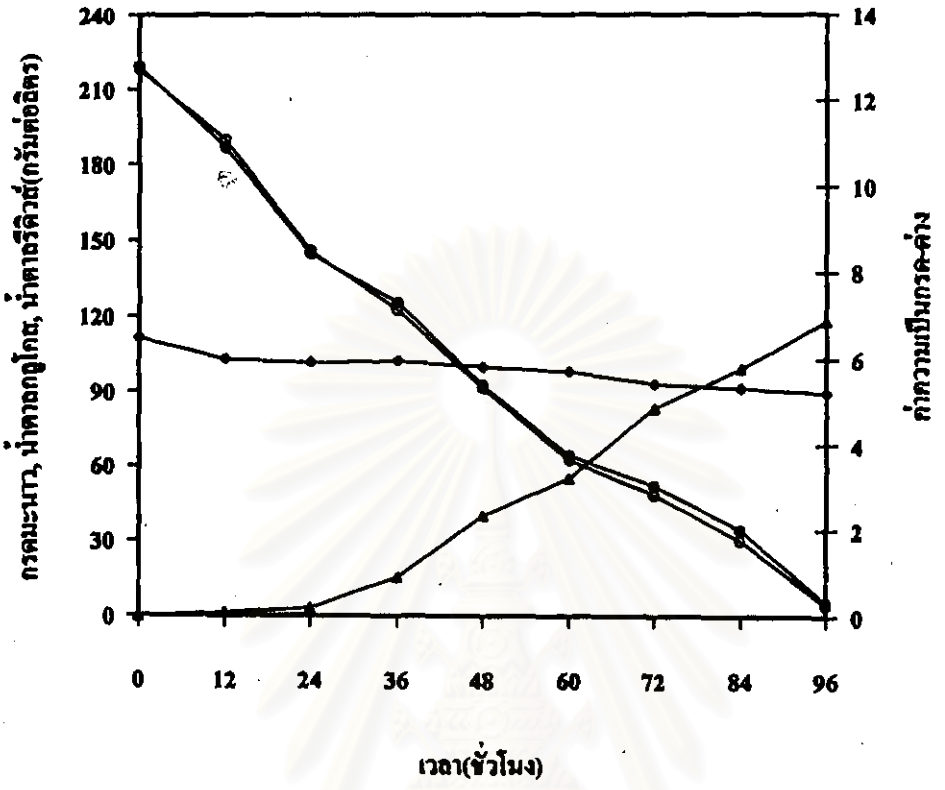
รูปที่ 7. แสดงผลการผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 5 ลิตรจากเซลล์ตรึง *C. oleophila* C-73 โดยใช้เซลล์ตรึงที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5-1.0 มิลลิเมตร จำนวนเซลล์ตรึงเริ่มต้น 15 กรัมเม็ดเซลล์ตรึงต่อลิตร ควบคุมการหมักที่ 28 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 vvm.

▲ กรดมะนาว ○ น้ำตาลกลูโคส
● น้ำตาลรีดิวซ์ ◆ ค่าความเป็นกรดด่าง

3.2.5 ผลการแปรผันอัตราการให้อากาศ

การผลิตกรดมะนาวโดยยีสต์เป็นการหมักในภาวะที่ต้องการออกซิเจนการเพิ่มปริมาณออกซิเจนที่ละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อ จะทำให้การผลิตกรดมะนาวเพิ่มสูงขึ้นในขณะเดียวกันปริมาณกรดไอโซซิตริค (Isocitric acid) จะลดลง(Okoshi *et.al.*,1987) นอกจากการกวนอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งเป็นการเพิ่มการละลายและการถ่ายเทออกซิเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ดีขึ้นแล้ว การให้อากาศเข้าสู่ถังหมักโดยตรงก็เป็นอีกวิธีหนึ่ง Chung และ Chang (1988) รายงานว่าการผลิตกรดมะนาวจะเพิ่มมากขึ้นเมื่อให้ออกซิเจนบริสุทธิ์เข้าไปในถังหมัก ดังนั้นในการทดลองนี้จึงทำการแปรผันอัตราการให้อากาศเท่ากับ 0.5, 1.0 และ 1.5 vvm โดยนำเซลล์ตรึงที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5-1.0 มิลลิเมตรจำนวน 15 กรัมเม็ดเซลล์ตรึงต่อลิตร ใส่ลงไปในถังหมักที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตกรดมะนาวที่มีปริมาตรเริ่มต้น 3.5 ลิตร ควบคุมอัตราการให้อากาศ 0.5, 1.0 และ 1.5 vvm ตามลำดับ ควบคุมการหมักที่อุณหภูมิ 28 เซลเซียส และอัตราการกวนที่ 600 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างเพื่อไปวิเคราะห์ทุก 12 ชั่วโมง

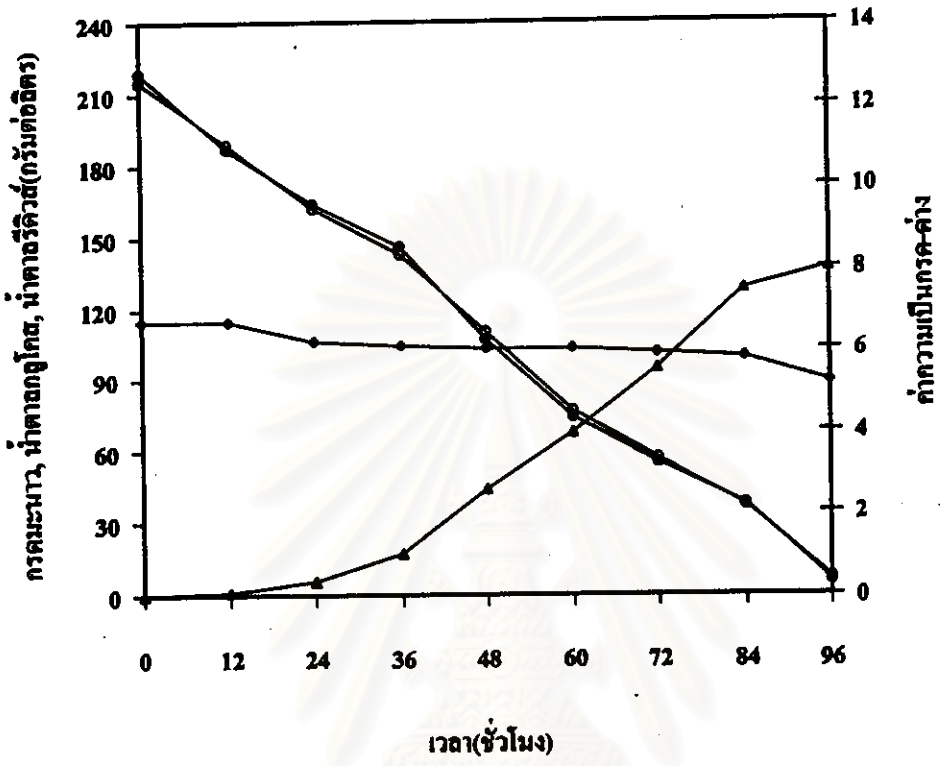
ผลการทดลอง เมื่อควบคุมการให้อากาศที่ 0.5 vvm แสดงในรูปที่ 8ก. จากการทดลองพบว่าผลผลิตกรดมะนาวจากเซลล์ตรึง *C. oleophila* C-73 ที่ได้เท่ากับ 118.84 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 96 ของการหมัก อัตราการผลิตกรดมะนาวประมาณ 1.90 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำหมักเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย



รูปที่ 8ก. แสดงผลการผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 5 ลิตรจากเซลล์ตรึง *C. oleophila* C-73 โดยใช้จำนวนเซลล์ตรึงเริ่มต้น 15 กรัมเม็ดเซลล์ตรึงต่อลิตร ควบคุมการหมักที่ 28 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 0.5 vvm

▲ กรดมะนาว ○ น้ำตาลกลูโคส
● น้ำตาลรีดิวซ์ ◆ ค่าความเป็นกรดด่าง

เมื่อใช้อัตราการให้อากาศเป็น 1.0 vvm สำหรับผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 5 ลิตรในสภาวะเดียวกัน ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 8 ข. ผลผลิตกรดมะนาวที่ได้สูงสุดเท่ากับ 137.07 กรัมต่อลิตรที่ชั่วโมงที่ 96 ของการหมัก อัตราการผลิตเท่ากับ 2.25 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

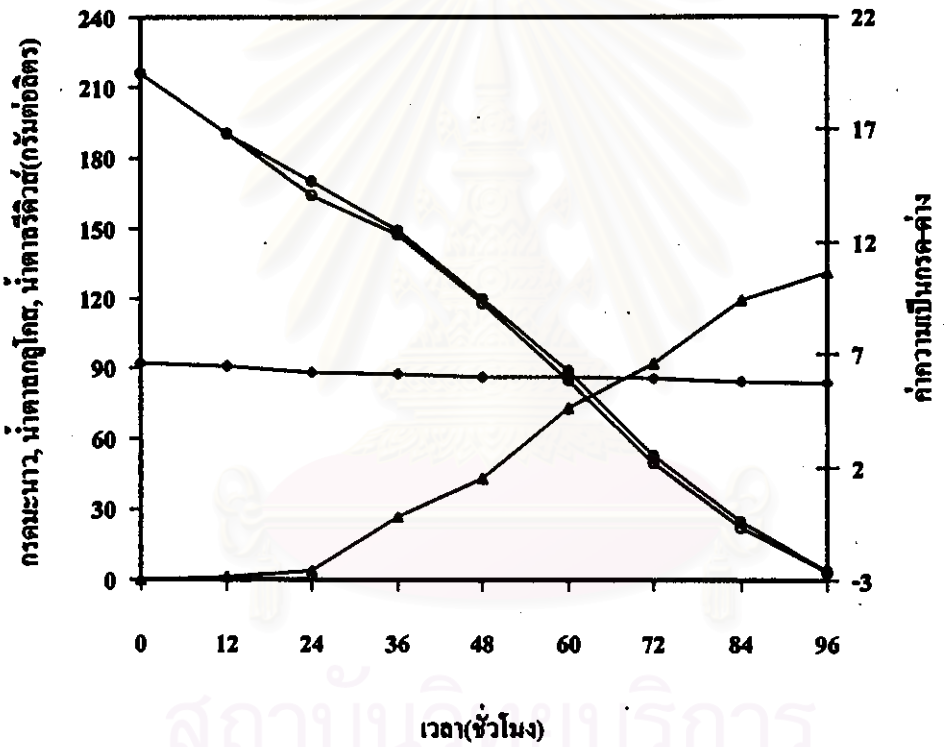


รูปที่ 8ข. แสดงผลการผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 5 ลิตรจากเซลล์ตรึง *C. oleophila* C-73 โดยใช้จำนวนเซลล์ตรึงเริ่มต้น 15 กรัมเม็ดเซลล์ตรึงต่อลิตร ควบคุมการหมักที่ 28 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 vvm

▲ กรดมะนาว ○ น้ำตาลกลูโคส
● น้ำตาลรีดิวซ์ ◆ ค่าความเป็นกรดด่าง

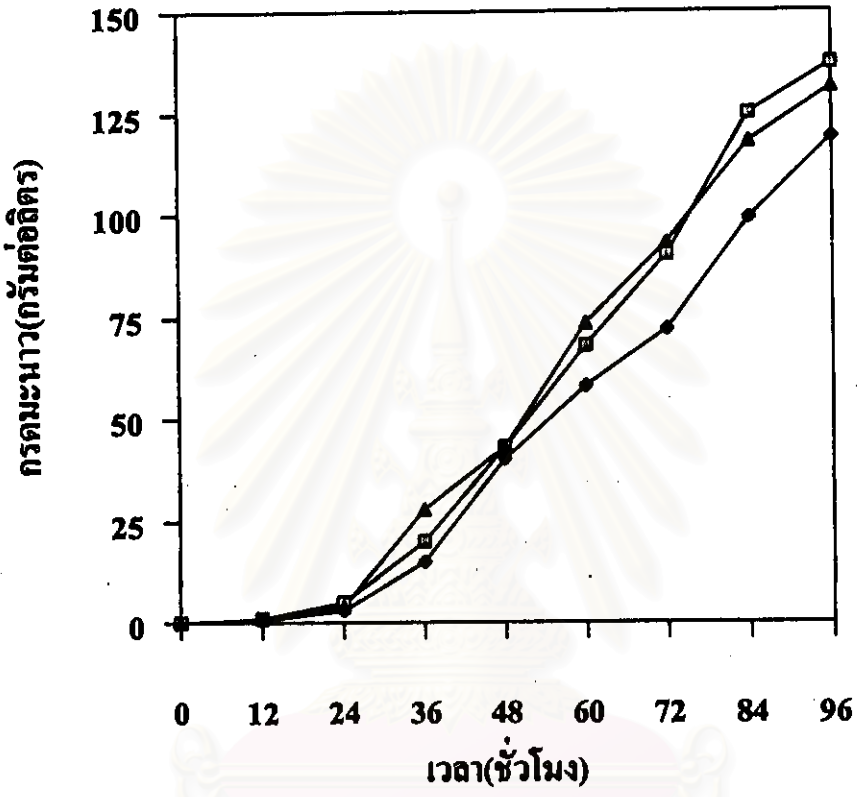
เมื่อเพิ่มอัตราการให้อากาศเป็น 1.5 vvm ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 8 ค. พบว่าอัตราการเจริญเติบโตเพิ่มมากขึ้น แต่อัตราการผลิตกรดมะนาวลดลง ผลผลิตกรดมะนาวที่ได้เท่ากับ 130.84 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 96 ของการหมัก อัตราการผลิตกรดมะนาวประมาณ 2.05 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง เปรียบเทียบผลผลิตกรดมะนาวเมื่อควบคุมการให้อากาศเท่ากับ 0.5, 1.0 และ 1.5 vvm ได้ผลการ

ทดลองแสดงในรูปที่ 8ง. เมื่อคิดผลผลิตกรดมะนาวที่ได้กับปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ใช้ไปเท่ากับ 55.44, 64.11 และ 61.39 จะเห็นว่าอัตราการผลิตกรดมะนาวเมื่อให้อากาศ 1 vvm ให้ผลผลิตสูงที่สุด จึงเลือกอัตราการ 1 vvm ซึ่งสอดคล้องกับการผลิตกรดมะนาวจากเซลล์อิสระ *C. oleophila* C-73 จากการศึกษาของประเสริฐ หาญเมืองใจ (2537) ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงควบคุมอัตราการให้อากาศที่ 1 vvm



รูปที่ 8ค. แสดงผลการผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 5 ลิตรจากเซลล์ตรึง *C. oleophila* C-73 โดยใช้จำนวนเซลล์ตรึงเริ่มต้น 15 กรัมเม็ดเซลล์ตรึงต่อลิตร ควบคุมการหมักที่ 28 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1.5 vvm

▲ กรดมะนาว ○ น้ำตาลกลูโคส
● น้ำตาลรีดิวซ์ ◆ ค่าความเป็นกรดด่าง



รูปที่ 8ง. แสดงผลการผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 5 ลิตรจากเซลล์ตรึง *C. oleophila* C-73 เมื่อทำการแปรผันอัตราการให้อากาศเท่ากับ 0.5 , 1.0 และ 1.5 vvm โดยใช้จำนวนเซลล์ตรึงเริ่มต้น 15 กรัมเม็ดเซลล์ตรึงต่อลิตร ควบคุมการหมักที่ 28 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที

◆ 0.5 vvm

▣ 1.0 vvm

▲ 1.5 vvm

3.3 ผลการควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่าง

จากการทดลองของประเสริฐ หาญเมืองใจ (2537) พบว่าการผลิตกรดมะนาวจากเซลล์อิสระของ *C. oleophila* C-73 ได้ควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่าง ของอาหารเลี้ยงเชื้อในถังหมัก โดยใช้แคลเซียมคาร์บอเนต ประมาณ 120 กรัมต่อลิตร ซึ่งแคลเซียมคาร์บอเนตจะทำให้น้ำหมักมีสีขาวขุ่น ซึ่งยากต่อการให้อากาศและการกวนอาหารเลี้ยงเชื้อ การแยกเซลล์ออกจากน้ำหมักทำได้ยากเมื่อปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตสูงมากๆ นี้ทำให้เมื่อยีสต์ผลิตกรดมะนาวออกมากโดยกรดมะนาวจะรวมตัวกับแคลเซียมคาร์บอเนตได้เกลือแคลเซียมซิเตรท ($C_6H_5O_7C_a$) ซึ่งละลายอยู่ในน้ำหมักมีผลทำให้น้ำหมักมีความหนืดสูงขึ้นตามปริมาณกรดมะนาวที่ยีสต์สร้างขึ้นมา ทำให้มีปัญหาในการกวนและการให้อากาศและการหมุนเวียนอากาศในถังหมัก เมื่อความหนืดเพิ่มมากขึ้นจะต้องมีการเพิ่มความเย็นให้แก่ความถังหมักมากขึ้น ทำให้สูญเสียพลังงานในการหมักมากขึ้น (Carttedge, 1987) การผลิตกรดมะนาวโดยยีสต์ในระดับถังหมัก นอกจากแคลเซียมคาร์บอเนตแล้ว อาจควบคุมความเป็นกรด-ด่าง โดยใช้ด่างแก่ เช่น โซเดียมไฮดรอกไซด์ โปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ และแคลเซียมไฮดรอกไซด์ เป็นต้น จากการทดลองของประเสริฐ หาญเมืองใจ (2537) พบว่าการใช้ด่างแก่ในการควบคุมความเป็นกรด-ด่าง ของการผลิตกรดมะนาวโดยเซลล์อิสระ *C. oleophila* C-73 นั้นผลผลิตกรดมะนาวค่อนข้างต่ำ ดังนั้นในการทดลองนี้จึงควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่าง ในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตกรดมะนาวโดยการแบ่งเติมปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนต การใช้แคลเซียมคาร์บอเนตร่วมกับโซเดียมไฮดรอกไซด์ และแคลเซียมออกไซด์ (CaO_2)

3.3.1 ผลการควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างโดยการแบ่งเติมปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนต

ทำการหมักจากเซลล์ตรึง *C. oleophila* C-73 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยมีอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตกรดมะนาวเริ่มต้น จำนวน 3.0 ลิตร ซึ่งมีปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตเริ่มต้น 35 กรัมต่อลิตร จำนวนเซลล์ตรึงเริ่มต้น 15 กรัมเซลล์ตรึงต่อลิตร ควบคุมอัตราการกวนที่ 600 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 vvm. หลังจากการหมักจะทำการเติมแคลเซียมคาร์บอเนต 15 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 24, 48, 60, 72 และ 84 ของการหมัก ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 4 พบว่าเซลล์ตรึง *C. oleophila* C-73 สามารถผลิตกรดมะนาวได้สูงกว่าเมื่อเติมแคลเซียมคาร์บอเนต 100 กรัมต่อลิตร ตั้งแต่เริ่มต้น โดยให้ผลผลิตกรดมะนาวสูงสุดเท่ากับ 140.19 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 96 ของการหมัก อัตราการผลิตกรดมะนาวเท่ากับ 2.78 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง เมื่อวัดค่าความหนืดของน้ำหมักจะมีค่าเพิ่มขึ้นเรื่อยๆและมีค่าความหนืดสูงเท่ากับ 3872 เซนติพอยซ์ ในชั่วโมงที่ 96 ของการหมัก ในระหว่างการหมักค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำหมักจะลดลงเรื่อยๆ และจะคงที่เมื่อค่าความเป็นกรด-ด่างมีค่าประมาณ 4

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4 การผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 5 ลิตร ด้วยเซลล์ตรึง *C. oleophila* C-73 จำนวนเซลล์ตรึงเริ่มต้น 15 กรัมเซลล์ตรึงต่อลิตร หมักที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 600 รอบ ต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm ควบคุมค่าความเป็นกรดด่างของน้ำหมักโดยการแบ่งเติมปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนต 35 กรัมต่อลิตรที่ชั่วโมงที่ 0 หลังจากนั้นเติมแคลเซียมคาร์บอเนต 15 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 24, 48, 60, 72 และ 84

เวลา (ชั่วโมง)	ความเป็นกรด-ด่าง	ปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนต (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณกรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลกลูโคส (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ (กรัมต่อลิตร)	ค่าความหนืด (เซนติพอยซ์)
0	6.42	35	0.00	224.85	218.21	25
12	6.20	35	0.27	193.60	198.40	25
24	5.88	50	4.00	175.53	173.20	50
36	5.91	50	16.28	150.82	143.58	100
48	5.83	65	47.56	119.84	122.53	346
60	6.06	70	80.43	78.24	76.95	560
72	5.35	85	114.24	58.47	49.51	1042
84	4.05	100	136.25	30.04	31.10	-
96	3.99	100	140.19	7.50	19.47	3872

3.3.2 ผลการควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่าง โดยใช้แคลเซียมคาร์บอเนตร่วมกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์

จากการทดลองในข้อ 3.3.1 พบว่าน้ำหมักมีความหนืดสูง ดังนั้นในการทดลองนี้ จึงทำการควบคุมค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตกรดมะนาวโดยใช้แคลเซียมคาร์บอเนตจำนวน 50 กรัมต่อลิตร ตั้งแต่เริ่มต้นของการหมัก ร่วมกับโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 3 โมลาร์ เพื่อควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตกรดมะนาวคงที่ประมาณ 6.4 ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 5 พบว่าเซลล์ตรึง *C. oleophila* C-73 สามารถผลิตกรดมะนาวได้ช้ากว่าควบคุมด้วยแคลเซียมคาร์บอเนตอย่างเดียว แต่ความหนืดของน้ำหมักลดลงเป็น 925 เซนติพอยซ์ ค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำหมักคงที่อยู่ที่ 6.4 ปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้เท่ากับ 117.28 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 96 ของการหมักยัตราการผลิตกรดมะนาวเท่ากับ 1.8 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ผลผลิตกรดมะนาวเมื่อเทียบจากปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ถูกใช้ไปเท่ากับ 55.26

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 5 การผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 5 ลิตร ด้วยเซลล์ตรึง *C. oleophila* C-73 ใช้เซลล์ตรึงเริ่มต้น 15 กรัมเม็ดเซลล์ตรึงต่อลิตร หมักที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลล์เซียส อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm ควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างโดยใช้แคลเซียมคาร์บอเนตเริ่มต้น 50 กรัมต่อลิตรร่วมกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 3 โมลาร์

เวลา (ชั่วโมง)	ความเป็นกรด-ด่าง	ปริมาณกรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลกลูโคส (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ (กรัมต่อลิตร)	ค่าความหนืด (เซนติพอยซ์)
0	6.55	0.00	215.89	216.97	25
12	6.40	0.54	194.52	193.67	25
24	6.40	4.68	173.93	175.43	50
36	6.38	27.10	131.12	134.54	100
48	6.40	49.47	102.50	105.12	200
60	6.40	75.17	73.88	70.32	325
72	6.38	91.77	44.92	47.83	425
84	6.38	96.65	36.87	35.76	625
96	6.38	117.28	3.64	5.72	925

3.3.3 ผลการควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่าง ด้วย แคลเซียมออกไซด์

เนื่องจากปัญหาความหนืดของน้ำหมักเมื่อทำการควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่าง ด้วยแคลเซียมคาร์บอเนตจึงทำการควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำหมักด้วยแคลเซียมออกไซด์ โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตกรดมะนาวปริมาณเริ่มต้น 3.0 ลิตร ปริมาณเซลล์ตรึงเริ่มต้น 15 กรัมเซลล์ตรึงต่อลิตร ควบคุมอัตราการกวนที่ 600 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 vvm อุณหภูมิในการหมัก 28 องศาเซลล์เซียส ควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำหมักด้วยสารละลายแคลเซียมออกไซด์เข้มข้นร้อยละ 40 ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 6 ผลการทดลองพบว่าอัตราการผลิตกรดมะนาวเท่ากับ 1.4 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ผลผลิตกรดมะนาวสูงสุดเท่ากับ 98.50 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 96 ของการหมัก อาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการหมักมีความหนืดเท่ากับ 650 เซนติพอยซ์ ในชั่วโมงที่ 96 ของการหมัก ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 5.63

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 6 การผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 5 ลิตร ด้วยเซลล์ตรึง *C. oleophila* C-73 โดยใช้เซลล์ตรึงเริ่มต้น 15 กรัมเมื่อเซลล์ตรึงต่อลิตร หมักที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm ควบคุมค่าความเป็นกรดด่างด้วยแคลเซียมออกไซด์

เวลา (ชั่วโมง)	ความเป็นกรด-ด่าง	ปริมาณกรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลกลูโคส (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ (กรัมต่อลิตร)	ค่าความหนืด (เซนติพอยซ์)
0	6.34	0.00	199.51	202.68	25
12	5.84	0.88	186.40	190.53	25
24	5.45	7.14	144.49	145.90	25
36	5.82	26.56	105.04	107.32	25
48	5.72	45.22	76.84	79.24	50
60	5.75	74.59	53.80	55.16	100
72	5.84	85.25	24.38	26.78	450
84	5.63	93.56	1.14	3.29	650
96	5.63	98.50	0.00	0.00	650

3.4 ปริมาณกลูโคสเริ่มต้นที่เหมาะสม

Shah และคณะ (1993) ได้รายงานการผลิตกรดมะนาวจาก *Y. lipolytica* (DS-1) โดยแปรผันปริมาณน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นในช่วง 100-300 กรัมต่อลิตร พบว่าปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นที่เหมาะสมคือ 220 กรัมต่อลิตร Rymowicz และคณะ (1993) รายงานผลของปริมาณกลูโคสเริ่มต้นมีผลต่อการผลิตกรดมะนาวของเซลล์ตรึง *Y.lipolytica* A.101 จากการทดลอง 3.1-3.3 ใช้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์ 200-220 กรัมต่อลิตร จะพบว่าน้ำหมักมีความหนืดสูง ดังนั้นในการทดลองนี้จึงทำการแปรผันปริมาณน้ำตาลกลูโคส เพื่อหาปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหมาะสมสำหรับผลิตกรดมะนาวจากเซลล์ตรึงของ *C. oleophila* C-73 ที่ให้ความหนืดที่เหมาะสม ทำการแปรผันปริมาณน้ำตาลกลูโคส 150, 160, 180 200 และ 220 กรัมต่อลิตร เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง

ผลการทดลองเมื่อใช้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้น 150 กรัมต่อลิตร แสดงในตารางที่ 7 ก อัตราการผลิตกรดมะนาวประมาณ 1.74 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ผลผลิตกรดมะนาวเท่ากับ 113.26 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 96 ของการหมัก ความหนืดสูงสุดเท่ากับ 1425 เซนติพอยซ์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 7 ก. การผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 5 ลิตร ด้วยเชลล์ตรึง *C. oleophila* C-73 โดยใช้ปริมาณเชลล์ตรึงเริ่มต้น15 กรัมเชลล์ตรึงต่อลิตร ปริมาณน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น 150 กรัมต่อลิตร หมักที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 vvm. ควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยแคลเซียมคาร์บอเนต

เวลา (ชั่วโมง)	ความเป็นกรด-ด่าง	ปริมาณกรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลกลูโคส (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ (กรัมต่อลิตร)	ค่าความหนืด (เซนติพอยซ์)
0	6.65	0.00	150.66	153.26	25
12	6.28	0.56	133.73	135.74	25
24	6.09	8.19	115.53	118.44	50
36	6.17	25.46	72.16	78.90	100
48	6.10	56.69	54.67	68.80	200
60	5.99	64.21	23.38	21.07	425
72	5.89	84.06	6.39	8.67	725
84	5.83	109.08	0.00	0.00	1125
96	5.83	113.26	0.00	0.00	1425

เมื่อเพิ่มปริมาณน้ำตาลกลูโคสเป็น 160 กรัมต่อลิตร ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 7ข. อัตราการผลิตกรดมมะนาวประมาณ 1.70 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ผลผลิตสูงสุดเท่ากับ 126.94 กรัมต่อลิตร ค่าความหนืดของน้ำหมักเพิ่มขึ้นเป็น 1550 เซนติพอยซ์ ในชั่วโมงที่ 96 ของการหมัก

ตารางที่ 7ข การผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 5 ลิตร ด้วยเซลล์ตรึง *C. oleophila C-73* ปริมาณเซลล์ตรึงเริ่มต้น 15 กรัมเซลล์ตรึงต่อลิตร ปริมาณน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น 160 กรัมต่อลิตร หมักที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลล์เซียส อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 vvm. ควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยแคลเซียมคาร์บอเนต

เวลา (ชั่วโมง)	ความเป็นกรด-ด่าง	ปริมาณกรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลกลูโคส (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ (กรัมต่อลิตร)	ค่าความหนืด (เซนติพอยซ์)
0	6.60	0.00	160.87	161.54	25
12	6.27	0.21	132.17	133.23	25
24	6.08	10.91	104.55	105.47	50
36	6.02	41.43	68.81	69.34	100
48	5.77	72.68	40.79	41.87	200
60	4.69	75.21	31.05	30.98	950
72	4.44	93.06	14.50	15.28	1150
84	4.60	112.16	1.50	2.64	1200
96	4.59	126.94	0.00	0.00	1550

ปริมาณน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 180 กรัมต่อลิตร ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 7 ค. อัตราการผลิตกรดมะนาวประมาณ 1.70 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ผลผลิตกรดมะนาวสูงสุดเท่ากับ135 กรัมต่อลิตรและค่าความหนืดความหนืดสูงสุดเท่ากับ 2850 เซนติพอยซ์ ในชั่วโมงที่ 96 ของการหมัก

ตารางที่ 7ค การผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 5 ลิตร ด้วยเซลล์ตรึง *C. oleophila* C-73 ปริมาณเซลล์ตรึงเริ่มต้น 15 กรัมเซลล์ตรึงต่อลิตร ปริมาณน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น 180 กรัมต่อลิตร หมักที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 vvm. ควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยแคลเซียมคาร์บอเนต

เวลา (ชั่วโมง)	ความเป็นกรด-ด่าง	ปริมาณกรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลกลูโคส (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	ค่าความหนืด (เซนติพอยซ์)
0	6.70	0.00	180.42	181.49	25
12	6.37	0.21	145.96	147.33	25
24	6.13	12.40	125.16	124.91	50
36	6.03	40.51	97.50	98.37	100
48	5.72	77.96	53.50	56.15	300
60	4.83	92.76	25.01	27.19	900
72	4.64	123.11	11.94	15.43	2150
84	4.66	126.18	6.84	6.87	2350
96	4.57	135.00	0.00	0.00	2850

เมื่อเพิ่มปริมาณน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 200 และ 220 กรัมต่อลิตร ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 7ง. มละตารางที่ 7จ ตามลำดับ พบว่าอัตราการผลิตกรดมะนาวเพิ่มขึ้นคือ 2.3 และ 2.0 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับและผลผลิตสูงสุดใกล้เคียงกัน 137.05 และ 140.19 กรัมต่อลิตร ความหนืดของน้ำหมักสูงสุดเท่ากับ 3100 และ 3800 เซนติพอยซ์ ในชั่วโมงที่ 96 ของการหมักตามลำดับ พบว่าเมื่อปริมาณน้ำตาลกลูโคสเพิ่มสูงขึ้น ความหนืดของน้ำหมักจะสูงขึ้นตามลำดับ ค่าความหนืดของน้ำหมักจะเพิ่มมากขึ้นในชั่วโมงที่ 60-96 ของการหมักปริมาณน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ 180-220 กรัมต่อลิตร จะให้ผลผลิตกรดมะนาวใกล้เคียงกัน ผลผลิตกรดมะนาวคิดเป็นร้อยละ 74.2, 72 และ 64 ตามลำดับ ดังนั้นการผลิตกรดมะนาวจากเซลล์ตรึง *Candida oleophila* C-73 ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นที่เหมาะสม 200 กรัมต่อลิตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 7ง การผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 5 ลิตร ด้วยเชลล์ตรึง *C. oleophila C-73* ปริมาณเชลล์ตรึงเริ่มต้น 15 กรัมเชลล์ตรึงต่อลิตร ปริมาณน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น 200 กรัมต่อลิตร หมักที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 vvm. ควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยแคลเซียมคาร์บอเนต

เวลา (ชั่วโมง)	ความเป็นกรด-ด่าง	ปริมาณกรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลกลูโคส (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ (กรัมต่อลิตร)	ค่าความหนืด (เซนติพอยซ์)
0	6.71	0.00	201.62	204.15	25
12	6.70	0.50	183.21	181.50	25
24	6.21	5.84	178.50	163.89	50
36	6.06	25.14	138.72	145.48	100
48	6.04	47.09	109.74	107.55	250
60	6.13	77.77	87.41	89.62	950
72	5.20	108.35	68.43	65.35	1500
84	5.96	135.07	27.45	27.31	2800
96	5.92	137.05	7.77	6.25	3100

ตารางที่7จ การผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 5 ลิตร ด้วยเซลล์ตรึง *C. oleophila C-73* ปริมาณเซลล์ตรึงเริ่มต้น 15 กรัมเซลล์ตรึงต่อลิตร ปริมาณน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น 220 กรัมต่อลิตร หมักที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 vvm. ควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยแคลเซียมคาร์บอเนต

เวลา (ชั่วโมง)	ความเป็นกรด-ด่าง	ปริมาณกรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลกลูโคส (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ (กรัมต่อลิตร)	ค่าความหนืด (เซนติพอยซ์)
0	6.42	0.00	220.85	218.21	25
12	6.21	4.00	193.60	198.40	25
24	5.88	16.28	175.53	173.20	50
36	5.91	47.56	150.82	143.58	100
48	5.83	61.25	119.84	122.53	560
60	6.06	80.43	78.24	76.95	1042
72	5.35	114.24	58.47	49.51	2175
84	4.05	136.25	30.04	31.10	2775
96	3.99	140.19	7.50	10.47	3800

ตารางที่ 8 การผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 5 ลิตร ด้วยเซลล์อิสระ *C. oleophila* C-73 หมักที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลล์เซียส อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 vvm. ควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยแคลเซียมคาร์บอเนต

เวลา (ชั่วโมง)	ความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณกรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลกลูโคส (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ (กรัมต่อลิตร)	ค่าความหนืด (เซนติพอยซ์)
0	6.57	0.48	0.00	210.83	213.54	25
12	6.17	7.10	0.55	185.52	182.64	50
24	6.35	14.18	14.56	149.18	151.26	200
36	6.12	16.34	43.16	106.42	105.23	1000
48	6.06	17.26	60.84	78.12	77.68	2000
60	5.80	17.62	83.61	45.67	43.48	2100
72	5.17	17.78	94.48	21.51	23.50	2550
84	4.32	17.82	121.62	8.89	9.83	3000
96	4.27	17.54	147.47	0.28	0.00	3600