บทที่ 4
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาการแยกเซลล์ยีสต์ออกจากตะกอนแคลเซียมซิเทรตในน้ำหมักเพื่อนำกลับมาใช้ในการผลิตกรดมะนาวใหม่ โดยทำการผลิตกรดมะนาวด้วยเชื้อ *Candida oleophila* C-73 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

1.ศึกษาการเจริญของเชื้อ *Candida oleophila* C-73 เพื่อหาอายุของหัวเชื้อที่เหมาะสม โดยทำการเลี้ยงในอาหารเหลว (YM-medium) จนครบ 24 ชั่วโมง หาน้ำหนักเซลล์แห้งทุก 3 ชั่วโมง พบว่าที่ชั่วโมงที่ 9 เชื้อมีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุดคือ 0.301 ชั่วโมง$^{-1}$ โดยมีน้ำหนักเซลล์แห้งประมาณ 2.366 กรัมต่อลิตร ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของวาสนา แย้มเกตุ (2540) ดังนั้นในการผลิตกรดมะนาวด้วยเชื้อ *Candida oleophila* C-73 จึงใช้อายุหัวเชื้อที่เวลา 9 ชั่วโมง

2.การผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อ *Candida oleophila* C-73 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร พบว่าการผลิตกรดมะนาวโดยควบคุมค่าความเป็นกรดเบสแบบการแบ่งเติมแคลเซียมคาร์บอเนตได้ปริมาณกรดมะนาวมากที่สุดเท่ากับ 114.14 กรัมต่อลิตรและมีความหนืดของน้ำหมักมีค่าต่ำที่สุดคือ 3.0 กิโลกรัมต่อเมตรต่อวินาที ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของวาสนา แย้มเกตุ (2540) ดังนั้นการควบคุมค่าความเป็นกรดเบสด้วยวิธีแบ่งเติมแคลเซียมคาร์บอเนต ทำให้ค่าความเป็นกรดเบสของน้ำหมักไม่สูงเหมือนกับการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตลงไปทั้งหมดตั้งแต่ต้น ซึ่งจากรายงานของ Mattey (1992) รายงานไว้ว่าถ้าค่าความเป็นกรดเบสสูงเกินไป ยีสต์จะสร้างสารพวกโพลิออล อิริทริออลและแมนนิทอลแทนกรดมะนาว

3. ศึกษาสมบัติของเซลล์ยีสต์ แคลเซียมซิเทรต และน้ำหมัก เพื่อหาความแตกต่างและวิธีที่เหมาะสมที่ใช้แยก พบว่ายีสต์ แคลเซียมซิเทรต แคลเซียมคาร์บอเนตและ supernatant มีค่าความหนาแน่นเท่ากับ 1.0642, 2.1447, 2.6431 และ 1.0404 กรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ซึ่งแคลเซียมซิเทรตมีค่าความหนาแน่นมากกว่ายีสต์อยู่ประมาณ 2.0153 เท่า ขนาดของยีสต์และแคลเซียมซิเทรตมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 5.92 และ 12.67 ไมโครเมตรตามลำดับ และน้ำหมักมีค่าความหนืดเท่ากับ 3.0 กิโลกรัมต่อเมตรต่อวินาที จากค่าที่ได้เมื่อนำมาคำนวณความเร็วการตกตะกอนโดยแรงโน้มถ่วงของโลกจากกฎของสโต็คส์ (Stoke's Law) คือ $V_g = D^2(\rho_1-\rho_2)g/18\mu$ พบว่าความเร็วการตกตะกอนของยีสต์และแคลเซียมซิเทรตเท่ากับ 1.52×10^{-10} และ 3.24×10^{-8} เมตรต่อวินาที ตามลำดับ ซึ่งความเร็วแตกต่างกันประมาณ 213.16 เท่า แต่จากกฎสโต็คส์ (Geankoplis, 1993) ถ้าขนาดของอนุภาคมีความแตกต่างกันน้อยกว่า 10 เท่า อนุภาคทั้งหมดมีแนวโน้มตกตะกอนด้วยความเร็วเดียวกันจึงไม่สามารถใช้วิธีตกตะกอนโดยแรงโน้มถ่วงได้ ดังนั้นจึงอาศัยหลักการปรับความหนาแน่นของ supernatant เพื่อช่วยในการแยก โดยทำการคำนวณความเร็วการตกตะกอนจากกฎ

ของสโต๊คส์ด้วยการสมมติค่าความหนาแน่นของ supernatant จาก 1.0404 กรัมต่อมิลลิลิตรเป็น 1.06, 1.08, 1.10, 1.12 และ 1.14 กรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าความเร็วการตกตะกอนของยีสต์และแคลเซียมซิเทรตที่ความหนาแน่น 1.08 กรัมต่อมิลลิลิตร มีความเร็ว -1.01×10^{-10} และ 3.12×10^{-8} เมตรต่อวินาที ตามลำดับ โดยมีความแตกต่างกันมากที่สุดคือ 308.91 เท่า และจากความเร็วการตกตะกอนของยีสต์เป็นลบแสดงว่ามีทิศทางลอยขึ้นโดยที่แคลเซียมซิเทรตยังคงตกตะกอนเช่นเดิม แต่จากผลการคำนวณพบว่ายีสต์และแคลเซียมซิเทรตจะใช้เวลาในการเคลื่อนที่ 1 เซนติเมตรนาน 27,502.75 และ 89.03 ชั่วโมง ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าความเร็วในการตกตะกอนของทั้งสองนั้นช้ามาก ดังนั้นการใช้วิธีปรับความหนาแน่นของ supernatant แล้วตกตะกอนด้วยแรงโน้มถ่วงไม่สามารถใช้ในการแยกเซลล์ยีสต์ออกจากแคลเซียมซิเทรตได้

4.การแยกเซลล์ยีสต์ออกจากน้ำหมักด้วยการใช้คอลัมน์แบบสั้น ซึ่งมีความยาวคอลัมน์ 15 เซนติเมตร โดยปรับความหนาแน่นของน้ำหมักด้วยสารละลายน้ำตาลซูโครสที่ความเข้มข้นต่างๆ และมีการให้อากาศจากด้านล่างเพื่อให้สารผสมกระจายตัวและแยกจากกัน พบว่าภาวะที่แยกเซลล์ยีสต์ออกจากน้ำหมักได้ดีที่สุดคือการใช้สารละลายซูโครส 35 บริกส์ปริมาตร 600 มิลลิลิตรปรับความหนาแน่นของน้ำหมัก 400 กรัมได้ความหนาแน่นของสารผสม 1.14 กรัมต่อมิลลิลิตร โดยสามารถแยกได้ 33.53%ของน้ำหนักเซลล์แห้งทั้งหมด และจากการทดลองพบว่าสารผสมนั้นมีความหนืดมากเมื่อป้อนเข้าคอลัมน์สารผสมจะไม่กระจายและระยะเวลาที่อยู่ในคอลัมน์น้อย ทำให้ประสิทธิภาพการแยกไม่ดี จึงเปลี่ยนขนาดของคอลัมน์โดยเพิ่มความยาวของคอลัมน์เป็น 50 เซนติเมตร พบว่าการใช้สารละลายซูโครส 30 บริกส์ ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตรปรับความหนาแน่นของน้ำหมัก 500 กรัมนั้นได้ความหนาแน่นของสารผสม 1.14 กรัมต่อมิลลิลิตร สามารถแยกได้ดีที่สุด คือ 46.26%ของน้ำหนักเซลล์แห้ง จากการทดลองพบว่าการแยกโดยวิธีนี้ต้องใช้สารละลายน้ำตาลซูโครสมากถึง 5,000 มิลลิลิตรในการแยกน้ำหมัก 500 กรัม นอกจากนี้ปริมาณของแข็งที่ตกตะกอนและปริมาณเซลล์ยีสต์ที่แยกได้ยังมีปริมาณน้อยดังนั้นวิธีนี้จึงไม่เหมาะสมที่จะใช้แยกเซลล์จากน้ำหมัก

5. การแยกเซลล์ยีสต์ออกจากตะกอนแคลเซียมซิเทรตออกจากน้ำหมักชั่วโมงที่ 72 ด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาทีโดยการปรับความหนาแน่นด้วยสารละลายน้ำตาลซูโครส 25, 30 และ35 บริกส์ ปริมาตร 2,000 มิลลิลิตร ต่อน้ำหมัก 2.8 ลิตร พบว่าการปรับความหนาแน่นด้วยสารละลายน้ำตาลซูโครส 35 บริกส์และปั่นเหวี่ยง 2,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที ให้ค่าการแยกเซลล์ยีสต์สูงที่สุดคือ 61.46 % แต่การผลิตกรดมะนาวนั้นเซลล์ยีสต์ใช้กลูโคสในการเจริญและผลิตกรดมะนาวดังนั้นการใช้สารละลายน้ำตาลซูโครสปรับความหนาแน่นจึงไม่เหมาะสม เพราะไม่สามารถนำสารละลายน้ำตาลซูโครสที่ปรับความหนาแน่นกลับมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนได้ ซึ่งทำให้สิ้นเปลือง ดังนั้นจึงเปลี่ยนจากสารละลายน้ำตาลซูโครสเป็นสารละลายน้ำตาลกลูโคสแล้วปั่นเหวี่ยงที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที พบว่าที่ภาวะการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2,000 รอบต่อ

นาทีโดยการปรับความหนาแน่นด้วยสารละลายน้ำตาลกลูโคส 35 บริกส์ 2,000 มิลลิลิตรต่อน้ำหมัก 2.8 ลิตร ให้ค่าการแยกเซลล์ยีสต์สูงที่สุดคือ 64.98 % จึงนำภาวะการแยกโดยการปั่นเหวี่ยงที่ได้มาทำการผลิตกรดมะนาวโดยการเวียนเซลล์พบว่าค่าประสิทธิผลของการหมัก (productivity) ในการหมักครั้งที่ 1 มีค่าสูงสุดชั่วโมงที่ 60 เท่ากับ 1.218 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และเมื่อหมักครบชั่วโมงที่ 72 มีค่าเท่ากับ 1.118 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง โดยมีปริมาณกรดมะนาวที่ชั่วโมงที่ 72 เท่ากับ 80.52 กรัมต่อลิตร เมื่อนำเซลล์ยีสต์ที่เวียนได้มาทำการเลี้ยงเพื่อผลิตกรดมะนาวครั้งที่ 2 พบว่ามีกรดมะนาวปะปนจากการเวียนเซลล์กลับมา 22.77 กรัมต่อลิตร ค่าประสิทธิผลของการหมักครั้งที่ 2 สูงสุดที่ชั่วโมงที่ 24 มีค่าเท่ากับ 1.146 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และลดลงจนครบชั่วโมงที่ 72 มีค่าเท่ากับ 0.811 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และปริมาณกรดมะนาว 81.19 กรัมต่อลิตรที่ชั่วโมงที่ 72 เมื่อพิจารณาความสามารถของเชื้อที่ใช้น้ำตาลกลูโคสในการผลิตกรดมะนาว (Yp/s) ครั้งที่ 1 และ 2 ในชั่วโมงที่ 72 ของการหมักมีค่า 0.671 และ 0.450 กรัมต่อกรัมกลูโคสตามลำดับ พิจารณาค่าที่ได้เปรียบเทียบกับงานวิจัยของ Parente และคณะ (1995) ซึ่งมีค่าความสามารถของเชื้อที่ใช้น้ำตาลกลูโคสในการผลิตกรดมะนาว (Yp/s) ครั้งที่ 1, 2 และ 3 มีค่า 0.571, 0.475 และ 0.339 กรัมต่อกรัมกลูโคสตามลำดับ พบว่าแนวโน้มของ Yp/s ลดลงเช่นเดียวกันเมื่อเวียนเซลล์กลับมาใช้ใหม่ แต่จากงานวิจัยพบว่าการเวียนเซลล์กลับมาใช้ใหม่โดยการปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แต่อุณหภูมิที่ใช้ในการหมักคือ 28 องศาเซลเซียส อาจทำให้กลไกการควบคุมของเซลล์เปลี่ยนแปลงไป จึงทำให้ผลได้น้อยลงให้เกิดทำให้เกิดการยับยั้งเซลล์จึงเป็นผลให้ประสิทธิภาพของเซลล์ยีสต์ลดลง

6. การแยกเซลล์ยีสต์ออกจากแคลเซียมซิเทรตด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาทีโดยการปรับความหนาแน่นด้วยสารละลายน้ำตาลกลูโคส 35 บริกส์ จึงนำน้ำหมักชั่วโมงที่ 72 กับ 96 มาทำการแยกพบว่าความเร็วการปั่นเหวี่ยง 1,500 รอบต่อนาที สามารถแยกเซลล์ยีสต์จากน้ำหมักชั่วโมงที่ 72 ที่ผ่านการปรับความหนาแน่นแล้วดีที่สุดคือ 56.30 % ของน้ำหนักเซลล์แห้งทั้งหมดโดยมีกรดมะนาวปะปนมาเพียง 5.01 %ของกรดมะนาวทั้งหมด และแยกเซลล์ยีสต์จากน้ำหมักชั่วโมงที่ 96 ที่ความเร็วการปั่นเหวี่ยง 1,500 รอบต่อนาที สามารถแยกได้ดีที่สุดคือ 46.43 % ของน้ำหนักเซลล์แห้งทั้งหมดโดยมีกรดมะนาวปะปนมา 23.25 %ของกรดมะนาวทั้งหมด แสดงว่าความหนืดของน้ำหมักมีผลต่อการแยกเนื่องจากน้ำหมักชั่วโมงที่ 72 มีความหนืดน้อยกว่าชั่วโมงที่ 96 มาก

7. เมื่อนำภาวะการแยกโดยการปั่นเหวี่ยงที่ได้มาทำการเวียนเซลล์พบว่าการเวียนเซลล์จากน้ำหมักชั่วโมงที่ 96 เซลล์ยีสต์ที่เวียนกลับมาใช้ใหม่นั้นมีกิจกรรมในการผลิตกรดมะนาวสูงและเร็วกว่าการผลิตโดยเซลล์ยีสต์ที่ไม่ได้เวียนกลับมาใช้ใหม่ เมื่อพิจารณาค่าประสิทธิผลของการหมัก (productivity) ในการหมักครั้งที่1 มีค่าสูงสุดชั่วโมงที่ 84 เท่ากับ 1.017 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง แต่การผลิตครั้งที่ 2 และ 3 จะมีค่าสูงสุดชั่วโมงที่ 36 มีค่าเท่ากับ 1.474 และ 1.214 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงตามลำดับ เมื่อพิจารณาค่าประสิทธิผลของการหมักชั่วโมงที่ 96 พบว่าการหมักครั้งที่ 1, 2

และ 3 มีค่าเท่ากับ 1.002, 0.966 และ 0.795 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตเมื่อครบ 96 ชั่วโมงของการหมักครั้งที่ 1 เท่ากับ 96.20 กรัมต่อลิตร ครั้งที่ 2 เท่ากับ 92.77 กรัมต่อลิตรและครั้งที่ 3 เท่ากับ 76.30 กรัมต่อลิตร และพบว่าค่า Yp/s ครั้งที่ 1, 2 และ 3 เท่ากับ 0.580, 0.592 และ 0.410 กรัมต่อกรัมกลูโคส ตามลำดับ พิจารณาค่า Yp/s เปรียบเทียบกับงานวิจัยของ Parente และคณะ (1995) ซึ่งครั้งที่ 1, 2 และ 3 มีค่า Yp/s เท่ากับ 0.571, 0.475 และ 0.339 กรัมต่อกรัมกลูโคสตามลำดับ พบว่าค่า Yp/s มีค่าสูงกว่างานวิจัยของ Parente และคณะ (1995)

8. เมื่อนำภาวะการแยกโดยการปั่นเหวี่ยงที่ได้มาทำการเวียนเซลล์พบว่าการเวียนเซลล์จากน้ำหมักชั่วโมงที่ 72 เซลล์ยีสต์ที่เวียนกลับมาใช้ใหม่นั้นพบว่าค่าประสิทธิผลของการหมักในการหมักชั่วโมงที่ 72 ครั้งที่ 1, 2 , 3, 4, 5, 6 และ 7 มีค่าเท่ากับ 1.015, 0.969, 0.919, 1.274, 1.392, 1.287 และ 0.782 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ และเมื่อพิจารณาค่า Yp/s ของการหมักครั้งที่ 1, 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 มีค่าเท่ากับ 0.467, 0.557, 0.407, 0.603, 0.451, 0.551 และ 0.334 กรัมต่อกรัมกลูโคสตามลำดับ จากการเวียนเซลล์น้ำหมักชั่วโมงที่ 72 และ 96 จะพบว่าค่าประสิทธิผลของการหมักสูงสุดชั่วโมงที่ 36-48 ซึ่งแสดงว่าช่วงเวลานี้นั้นเซลล์มีประสิทธิภาพสูงสุดดังนั้นถ้าทำการเวียนเซลล์ในช่วงเวลานี้จะทำให้ได้เซลล์ที่มีประสิทธิภาพสูง

9. การเวียนเซลล์จากน้ำหมักชั่วโมงที่ 48 กลับมาใช้ใหม่โดย นำ supernatant มาปรับความหนาแน่นด้วยสารละลายน้ำตาลกลูโคสลงไปให้มีความหนาน่นเท่ากับ 1.08 กรัมต่อลิตรมีสารผสมรวม 4,600 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วแยกส่วนสารแขวนลอย กลับมาเวียนลงในถังหมักและเติมสารละลายสารสกัดจากยีสต์, สารละลายแร่ธาตุ และสารละลายน้ำตาลกลูโคสปรับให้มีความเข้มข้นน้ำตาลประมาณ 220 กรัมต่อลิตร แล้วทำการผลิตกรดมะนาวเซลล์ยีสต์ที่เวียนกลับมาใช้ใหม่พบว่าเซลล์ยีสต์ที่เวียนกลับมาใช้ใหม่นั้นมีค่าสัมประสิทธิ์ของการใช้น้ำตาลกลูโคสในการผลิตกรดมะนาว (Yp/s), ค่าสัมประสิทธิ์การผลิตกรดมะนาวจำเพาะ(Yp/x)และค่าประสิทธิผลของการหมัก (productivity) นั้นมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น แต่ค่าสามารถใช้น้ำตาลกลูโคสในการสร้างเซลล์ (Yx/s) นั้นมีแนวโน้มลดลง และเมื่อนำค่าสัมประสิทธิ์ของการใช้น้ำตาลกลูโคสในการผลิตกรดมะนาว (Yp/s) ที่ได้มาเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ Parente และคณะ ในปี 1995 ดังแสดงในตารางที่ 4.1 จะเห็นได้ว่าค่าสัมประสิทธิ์ของ Yp/s ที่ได้จากการทดลองมีค่าสูงกว่าและสามารถทำการเวียนเซลล์กลับมาผลิตกรดมะนาวครั้งใหม่ได้หลายครั้งโดยที่ค่า Yp/s นั้นไม่ลดลงเมื่อเทียบกับงานวิจัยของ Parente และคณะ (1995) ที่ทำการผลิตได้เพียง 3 ครั้งโดยที่ค่านั้นก็ลดลง และเมื่อพิจารณาค่าประสิทธิผลของการหมักในการหมักชั่วโมงที่ 48 ครั้งที่ 1, 2 , 3, 4, 5, 6 และ 7 มีค่าเท่ากับ 0.821, 1.077, 1.433, 1.561, 1.361, 1.415 และ 1.723 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ จากการพิจารณาค่าประสิทธิผลของการหมักพบว่าตั้งแต่การผลิตกรดมะนาวโดยการเวียนเซลล์ค่าประสิทธิผลของการหมักมีค่าสูงกว่างานวิจัย Enzminger กับ Asenjo (1986) ซึ่งทำ

การผลิตกรดมะนาวแบบต่อเนื่องมีค่าประสิทธิผลของการหมักเท่ากับ 0.830 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ในการผลิต 200 ชั่วโมง

ตารางที่ 4.1 การปรียบเทียบค่า Yp/s ที่ได้ กับงานวิจัยของ Parente และคณะ (1995)

การผลิตครั้งที่	ค่าสัมประสิทธิของ Yp/s(กรัมต่อกรัมกลูโคส)	
	การเวียนเซลล์ชั่วโมงที่ 48	งานวิจัยของ Parente และคณะ (1995)
1	0.458	0.571
2	0.556	0.475
3	0.779	0.339
4	0.522	-
5	0.546	-
6	0.543	-
7	0.507	-

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย