บทที่ 3

ผลการทดลอง

การศึกษาลักษณะการเจริญของเชื้อ *C. oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับการเจริญเติบโต

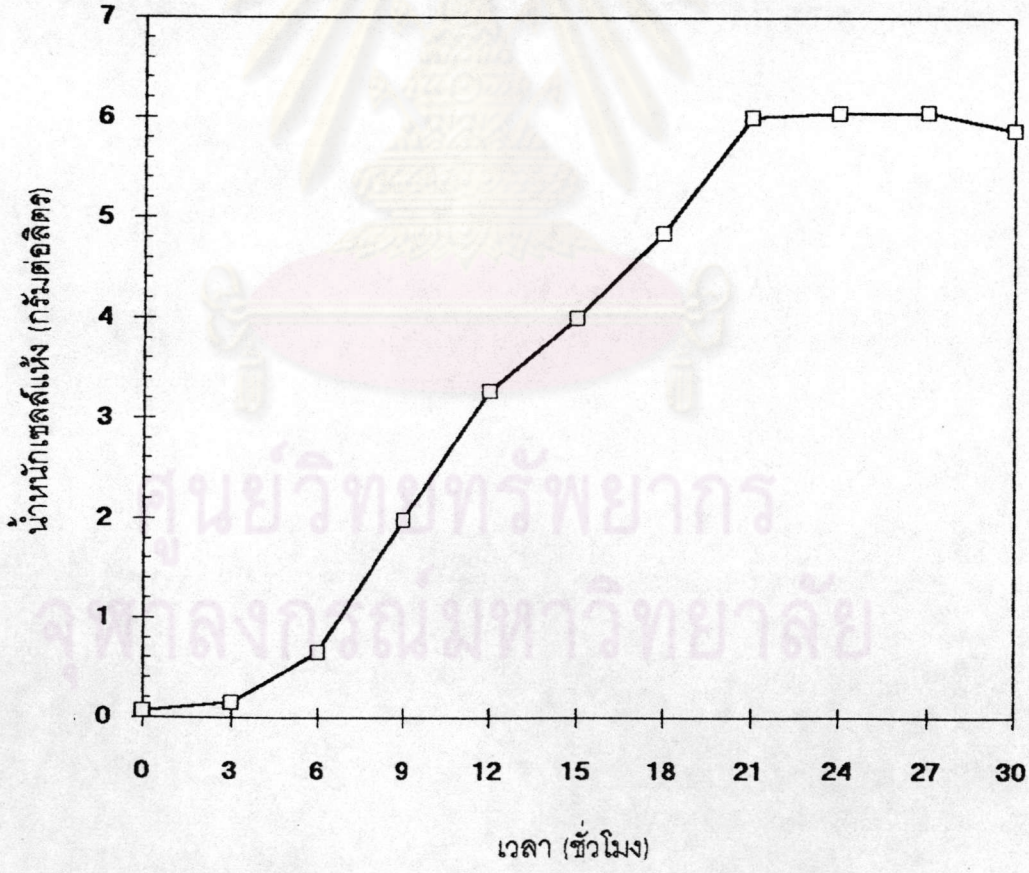
เลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับการเจริญเติบโต (Yeast Malt Extract Medium) ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุก 3 ชั่วโมง ติดตามลักษณะการเจริญโดยการหาน้ำหนักเซลล์แห้ง ผลการทดลองแสดงได้ในรูปที่ 3 พบว่า การเจริญของเชื้อเริ่มเข้าสู่การเจริญระยะทวีคูณ (logarithmic phase) ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 3 จนถึงชั่วโมงที่ 21 การเจริญเข้าสู่ช่วงปลายของระยะทวีคูณ (retardation phase) และเข้าสู่การเจริญระยะคงที่ (stationary phase) ในเวลาต่อมา การทดลองต่อไปจะเลือกใช้ช่วงของการเจริญในช่วงกลางของระยะทวีคูณ (mid logarithmic phase) คือ ชั่วโมงที่ 15 เพื่อให้ได้เซลล์ยีสต์มาทำการตรึงเซลล์ และนำเซลล์ตรึงไปใช้ในการผลิตกรดมะนาวต่อไป

การคัดเลือกสารพาหะที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการตรึงเซลล์ *C. oleophila* C-73 เพื่อผลิตกรดมะนาว

งานวิจัยนี้ทำการตรึงเซลล์โดยวิธีกักขัง ใช้สารพาหะในการตรึงเซลล์ 3 ชนิด คือแคลเซียมอัลจิเนต แคปปา-คาร์ราจิแนนและเจลลาติน จากการศึกษาการเจริญของเชื้อ *C. oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับการเจริญเติบโต จึงเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 15 ชั่วโมง แล้วนำเซลล์มาทำการตรึงเซลล์จุลินทรีย์ด้วยสารพาหะต่าง ๆ หลังจากนั้นนำเซลล์ตรึงของเชื้อ *C. oleophila* C-73 มาผลิตกรดมะนาว

เมื่อเลี้ยงเซลล์ตรึงเหล่านี้ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาว พบว่าเซลล์ตรึงที่ใช้เจลลาตินเป็นสารพาหะไม่สามารถใช้ในการผลิตกรดมะนาวได้ เนื่องจากเจลลาตินนั้นละลายทันทีในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาว ซึ่งอาจเกิดจากคุณสมบัติของเจลลาตินที่ไม่

เสถียรและแปรผันกลับได้ตามอุณหภูมิ ถึงแม้เพิ่มความเสถียรโดยเชื่อมไขว้กับฟอร์มัลดีไฮด์ในการทำเซลส์ตรึงแล้วก็ตาม แต่เซลส์ตรึงที่ใช้แคลเซียมอัลจิเนตและแคปปา-คาร์ราจิแนนเป็นสารพาหะสามารถเจริญและผลิตกรดมะนาวได้ เก็บตัวอย่างทุก 1 วัน ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 3ก,3ข และรูปที่ 4 พบว่าเซลส์ตรึงที่ใช้แคลเซียมอัลจิเนตเป็นสารพาหะผลิตกรดมะนาวได้ในอัตราที่ช้ากว่าการใช้แคปปา-คาร์ราจิแนนเป็นสารพาหะ คือ ประมาณ 22.08 และ 24.00 กรัมต่อลิตรต่อวัน ตามลำดับ แต่ปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้สูงสุดเมื่อใช้แคลเซียมอัลจิเนตเป็นสารพาหะสูงกว่าเมื่อใช้แคปปา-คาร์ราจิแนนเป็นสารพาหะเท่ากับ 135.87 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 8 ของการหมัก และ 115.98 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 7 ของการหมัก ตามลำดับ เนื่องจากงานวิจัยนี้พิจารณาปริมาณกรดมะนาวให้ได้สูงสุดเป็นหลัก ดังนั้นแคลเซียมอัลจิเนตจึงเป็นสารพาหะที่เหมาะสม ในการตรึงเซลส์ *C. oleophila* C-73 เพื่อผลิตกรดมะนาว



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

ตารางที่ 3ก การผลิตกรดมะนาว โดยการใช้เชื้อ *C. oleophila* C-73 ที่ตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที

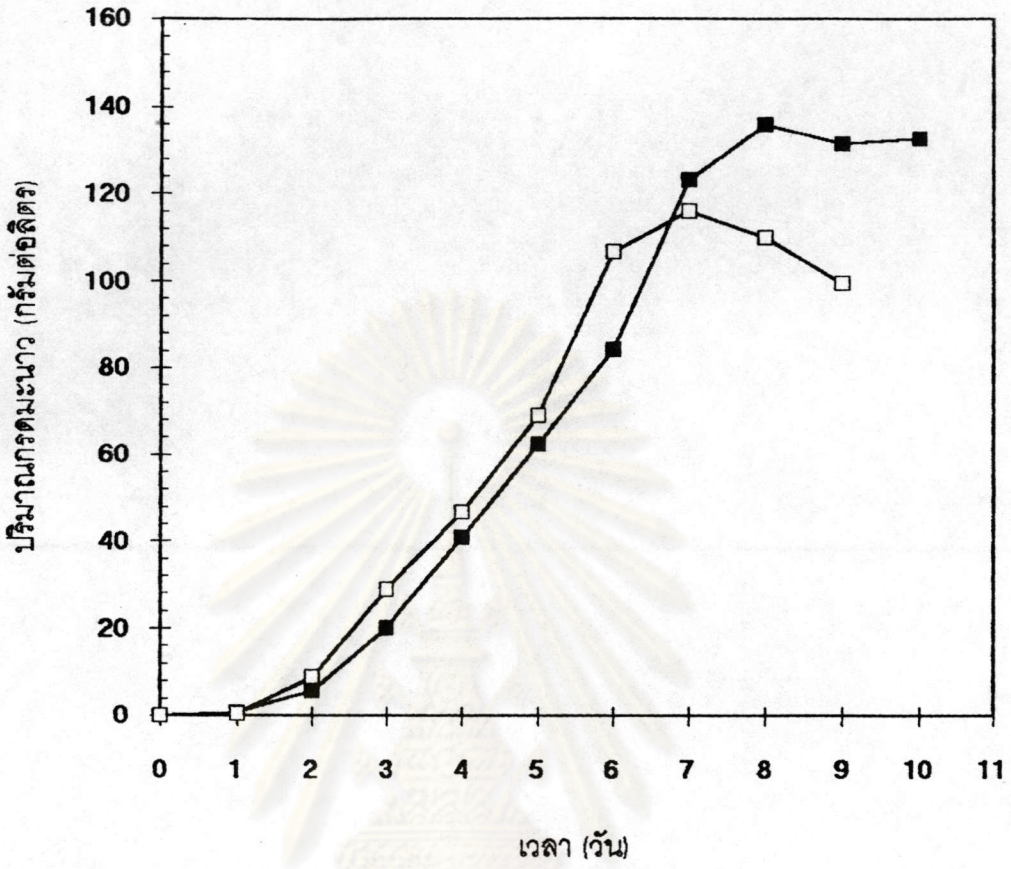
เวลา (วัน)	ความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง* (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณกรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ (กรัมต่อลิตร)
0	6.88	0.00	0.00	201.00
1	6.80	3.68	0.76	190.43
2	6.71	9.92	5.70	179.26
3	6.47	10.28	20.06	148.91
4	6.12	11.44	40.84	119.06
5	5.54	12.15	62.32	95.45
6	5.41	13.01	84.21	66.09
7	4.18	13.73	123.12	21.81
8	4.15	14.84	135.87	4.92
9	4.10	14.55	130.33	1.56
10	3.98	13.54	132.45	0.85

* น้ำหนักเซลล์แห้ง เป็นน้ำหนักเซลล์แห้งของเซลล์อิสระที่เกิดขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ

ตารางที่ 3ข การผลิตกรดมะนาว โดยการใช้เชื้อ *C. oleophila* C-73 ที่ตรึงด้วยแคปปา-คาร์ราจิแนน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที

เวลา (วัน)	ความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง* (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณกรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ (กรัมต่อลิตร)
0	6.85	0.00	0.00	202.05
1	6.80	5.80	0.53	193.52
2	6.60	8.07	8.82	170.73
3	6.40	11.39	28.88	135.94
4	6.16	13.49	46.74	107.92
5	6.08	14.09	68.90	78.56
6	4.97	15.08	106.74	23.75
7	4.43	15.92	115.98	9.17
8	4.34	14.17	109.71	1.97
9	4.21	13.73	99.18	0.52

* น้ำหนักเซลล์แห้ง เป็นน้ำหนักเซลล์แห้งของเซลล์อิสระที่เกิดขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ



<u>รูปที่ 4</u> เปรียบเทียบการผลิตกรดมะนาว โดยการใช้เชื้อ *C. oleophila* C-73 ที่ตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนตและแคปปา-คาร์ราจิแนน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที

โดยที่ ■ แคลเซียมอัลจิเนต

□ แคปปา-คาร์ราจิแนน

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเซลล์ *C. oleophila* C-73 เพื่อผลิตกรดมะนาว

1. ความเข้มข้นของแคลเซียมอัลจิเนตที่เหมาะสม

จากการที่แคลเซียมอัลจิเนตเป็นสารพาหะที่เหมาะสม ในการตรึงเซลล์ *C. oleophila* C-73 เพื่อผลิตกรดมะนาว และความเข้มข้นของแคลเซียมอัลจิเนตมีผลต่อความแข็งแรงของเม็ดเจลที่ได้ (Cheetham et al.,1979) การทดลองนี้จึงแปรผันความเข้มข้นของแคลเซียมอัลจิเนตที่ใช้ในการตรึงเซลล์เป็น 2,3,4 และ 5 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) นำเซลล์ตรึงที่ได้ไปผลิตกรดมะนาว เก็บตัวอย่างทุก 1 วัน

ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 4ก,4ข,4ค,4ง และรูปที่ 5 พบว่าปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้สูงสุด เมื่อใช้เซลล์ตรึงที่ความเข้มข้นของแคลเซียมอัลจิเนต 2,3 และ 4 เปอร์เซนต์เท่ากับ 111.91, 126.30 และ 135.87 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 8 ของการหมัก ตามลำดับ และมีอัตราการผลิตกรดมะนาวใกล้เคียงกันประมาณ 22.08 กรัมต่อลิตรต่อวัน แต่เมื่อใช้เซลล์ตรึงที่ความเข้มข้นของแคลเซียมอัลจิเนต 5 เปอร์เซนต์ ปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้สูงสุดเพียง 118.13 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 9 ของการหมัก และมีอัตราการผลิตกรดมะนาว 17.28 กรัมต่อลิตรต่อวัน ดังนั้นจึงเลือกใช้เซลล์ตรึงที่มีความเข้มข้นของแคลเซียมอัลจิเนต 4 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นความเข้มข้นของสารพาหะที่เหมาะสมในการทดลองต่อไป

2. อัตราส่วนของเซลล์ต่อแคลเซียมอัลจิเนตที่เหมาะสม

อัตราส่วนของเซลล์ต่อแคลเซียมอัลจิเนตที่เหมาะสม สำหรับการตรึงเซลล์เพื่อผลิตกรดมะนาว ทำได้โดยการเตรียมเซลล์ตรึงของเชื้อ *C. oleophila* C-73 ด้วยแคลเซียมอัลจิเนตแปรผันอัตราส่วนของเซลล์ต่อแคลเซียมอัลจิเนตเป็น 1:15,1:25,1:35 และ 1:45 (น้ำหนักต่อปริมาตร) นำเซลล์ตรึงที่ได้ไปเลี้ยงในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาว เก็บตัวอย่างทุก 1 วัน

ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 5ก,5ข,5ค,5ง และรูปที่ 6 พบว่าเมื่อใช้อัตราส่วนของเซลล์ต่อแคลเซียมอัลจิเนตต่างกัน อัตราการผลิตกรดมะนาวมีค่าใกล้เคียงกันประมาณ 22.56 กรัมต่อลิตรต่อวัน และปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้สูงสุดแตกต่างกันเล็ก

ตารางที่ 4ก การผลิตกรดมะนาว โดยการใช้เชื้อ *C. oleophila* C-73 ที่ตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต ความเข้มข้น 2 เปอร์เซนต์ ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที

เวลา (วัน)	ความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง* (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณกรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ (กรัมต่อลิตร)
0	6.80	0.00	0.00	201.00
1	6.75	3.82	0.95	180.82
2	6.62	10.98	7.47	164.58
3	6.43	11.28	25.24	147.43
4	6.27	12.60	42.75	115.57
5	5.54	12.78	66.48	74.35
6	5.45	13.46	80.35	50.27
7	5.38	14.25	97.94	24.34
8	4.82	14.48	111.91	9.48
9	4.76	14.42	109.64	1.27
10	4.45	14.39	101.79	0.56

* น้ำหนักเซลล์แห้ง เป็นน้ำหนักเซลล์แห้งของเซลล์อิสระที่เกิดขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ

ตารางที่ 4ข การผลิตกรดมะนาว โดยการใช้เชื้อ *C. oleophila* C-73 ที่ตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต ความเข้มข้น 3 เปอร์เซนต์ ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที

เวลา (วัน)	ความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง* (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณกรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ (กรัมต่อลิตร)
0	6.85	0.00	0.00	200.05
1	6.72	3.75	0.85	187.85
2	6.58	10.10	6.45	166.99
3	6.41	11.27	23.61	141.38
4	6.08	11.65	40.28	113.49
5	5.54	12.38	64.60	77.21
6	5.41	12.94	86.64	49.24
7	4.44	14.23	117.34	18.20
8	4.21	14.36	126.30	9.96
9	4.10	14.15	123.08	3.48
10	4.08	13.58	115.98	0.49

* น้ำหนักเซลล์แห้ง เป็นน้ำหนักเซลล์แห้งของเซลล์อิสระที่เกิดขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ

ตารางที่ 4ค การผลิตกรดมะนาว โดยการใช้เชื้อ *C. oleophila* C-73 ที่ตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต ความเข้มข้น 4 เปอร์เซนต์ ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที

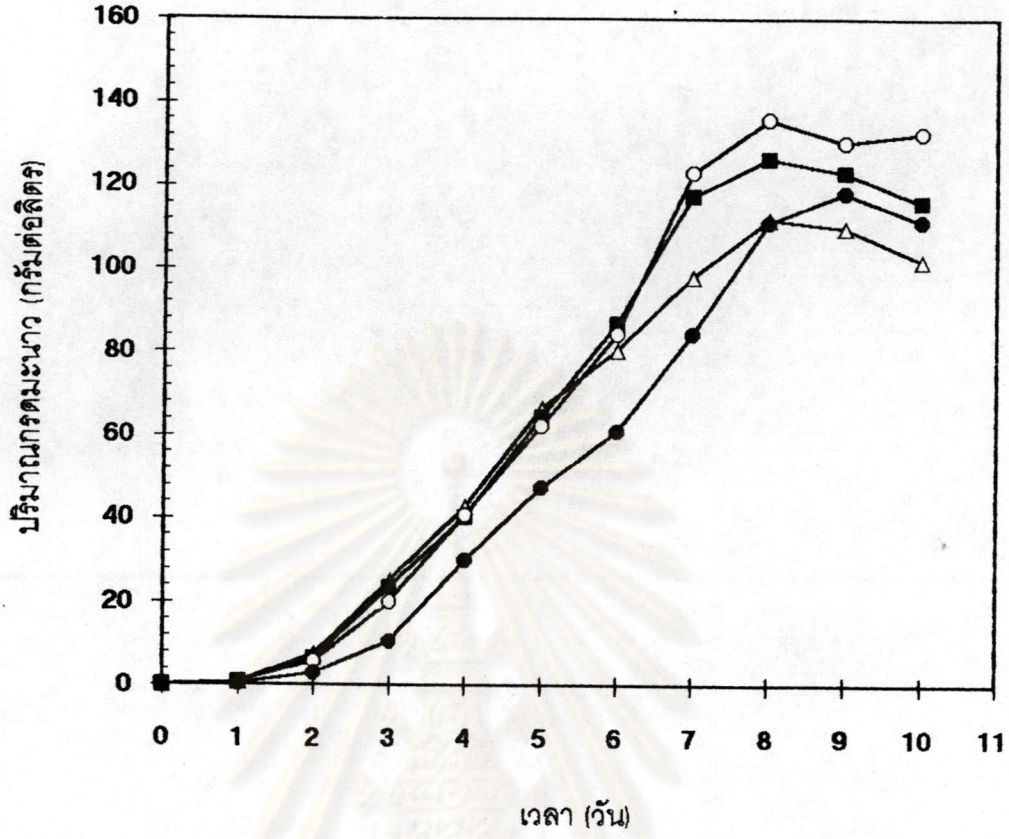
เวลา (วัน)	ความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง* (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณกรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ (กรัมต่อลิตร)
0	6.88	0.00	0.00	201.00
1	6.80	3.68	0.76	190.43
2	6.71	9.92	5.70	179.26
3	6.47	10.28	20.06	148.91
4	6.12	11.44	40.84	119.06
5	5.54	12.15	62.32	95.45
6	5.41	13.01	84.21	66.09
7	4.18	13.73	123.12	21.81
8	4.15	14.84	135.87	4.92
9	4.10	14.55	130.33	1.56
10	3.98	13.54	132.45	0.85

* น้ำหนักเซลล์แห้ง เป็นน้ำหนักเซลล์แห้งของเซลล์อิสระที่เกิดขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ

ตารางที่ 4ง การผลิตกรดมะนาว โดยการใช้เชื้อ *C. oleophila* C-73 ที่ตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต ความเข้มข้น 5 เปอร์เซนต์ ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที

เวลา (วัน)	ความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง* (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณกรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ (กรัมต่อลิตร)
0	6.85	0.00	0.00	200.05
1	6.76	2.10	0.41	190.87
2	6.68	6.67	2.86	185.10
3	6.60	7.42	10.64	148.58
4	6.38	9.98	29.94	110.54
5	6.03	10.63	47.42	82.82
6	5.56	11.70	60.80	61.66
7	5.41	12.42	84.18	42.47
8	4.82	13.08	111.01	15.94
9	4.48	13.20	118.13	9.31
10	4.26	12.37	111.26	4.90

* น้ำหนักเซลล์แห้ง เป็นน้ำหนักเซลล์แห้งของเซลล์อิสระที่เกิดขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ



รูปที่ 5 เปรียบเทียบการผลิตกรดมะนาว โดยการใช้เชื้อ *C. oleophila* C-73 ที่ตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต ความเข้มข้น 2,3,4 และ 5 เปอร์เซนต์ ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที

โดยที่ △ ความเข้มข้นของแคลเซียมอัลจิเนต 2 เปอร์เซนต์

■ ความเข้มข้นของแคลเซียมอัลจิเนต 3 เปอร์เซนต์

○ ความเข้มข้นของแคลเซียมอัลจิเนต 4 เปอร์เซนต์

● ความเข้มข้นของแคลเซียมอัลจิเนต 5 เปอร์เซนต์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I16696165

ตารางที่ 5ก การผลิตกรดมะนาว โดยการใช้เชื้อ *C. oleophila* C-73 ที่ตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต ในอัตราส่วนเซลล์ต่อแคลเซียมอัลจิเนตเท่ากับ 1:15 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที

เวลา (วัน)	ความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง* (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณกรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ (กรัมต่อลิตร)
0	6.85	0.00	0.00	200.05
1	6.83	4.40	0.61	190.25
2	6.78	7.00	4.86	179.46
3	6.49	10.21	17.82	135.43
4	6.12	11.90	39.43	115.62
5	5.53	12.62	61.14	90.43
6	5.46	13.32	78.41	67.12
7	4.57	14.49	109.82	26.24
8	4.10	14.66	131.02	9.74
9	4.08	13.96	124.02	4.08
10	4.03	13.70	116.13	1.35

* น้ำหนักเซลล์แห้ง เป็นน้ำหนักเซลล์แห้งของเซลล์อิสระที่เกิดขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ

ตารางที่ 5ข การผลิตกรดมะนาว โดยการใช้เชื้อ *C. oleophila* C-73 ที่ตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต ในอัตราส่วนเซลล์ต่อแคลเซียมอัลจิเนตเท่ากับ 1:25 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที

เวลา (วัน)	ความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง* (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณกรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ (กรัมต่อลิตร)
0	6.87	0.00	0.00	204.68
1	6.80	3.75	0.84	190.46
2	6.71	6.72	6.26	176.65
3	6.47	10.62	20.14	150.30
4	6.13	11.85	41.26	121.06
5	5.54	12.46	62.30	96.75
6	5.49	13.16	85.45	60.65
7	4.26	13.44	124.02	22.68
8	4.15	14.25	135.60	6.86
9	4.09	13.64	130.78	3.20
10	3.98	13.42	131.65	1.76

* น้ำหนักเซลล์แห้ง เป็นน้ำหนักเซลล์แห้งของเซลล์อิสระที่เกิดขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ

ตารางที่ 5ค การผลิตกรดมะนาว โดยการใช้เชื้อ *C. oleophila* C-73 ที่ตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต ในอัตราส่วนเซลล์ต่อแคลเซียมอัลจิเนตเท่ากับ 1:35 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที

เวลา (วัน)	ความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง* (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณกรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ (กรัมต่อลิตร)
0	6.88	0.00	0.00	200.05
1	6.80	3.68	0.69	190.04
2	6.72	7.80	4.94	178.60
3	6.48	8.92	21.81	154.82
4	6.14	11.15	39.98	123.11
5	5.83	11.98	56.85	99.06
6	5.39	12.32	91.20	52.16
7	4.58	13.18	109.44	25.26
8	4.15	13.25	124.79	16.23
9	4.12	14.00	136.56	3.26
10	4.03	13.04	130.31	1.94

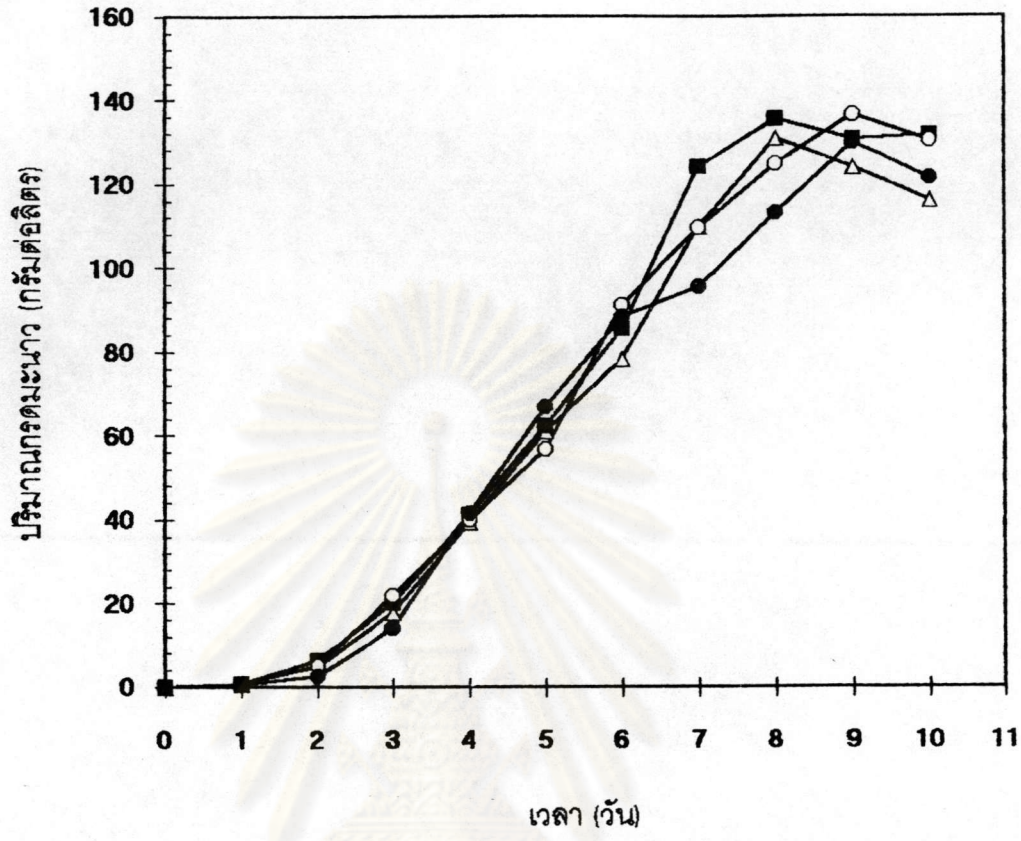
* น้ำหนักเซลล์แห้ง เป็นน้ำหนักเซลล์แห้งของเซลล์อิสระที่เกิดขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 5ง การผลิตกรดมะนาว โดยการใช้เชื้อ *C. oleophila* C-73 ที่ตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต ในอัตราส่วนเซลล์ต่อแคลเซียมอัลจิเนตเท่ากับ 1:45 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที

เวลา (วัน)	ความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง* (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณกรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ (กรัมต่อลิตร)
0	6.88	0.00	0.00	200.05
1	6.83	2.72	0.42	190.57
2	6.80	7.73	2.59	185.44
3	6.54	9.33	13.98	153.18
4	6.14	10.81	41.50	123.18
5	5.50	11.08	66.91	87.43
6	5.42	11.99	88.29	53.77
7	5.38	12.81	95.49	39.92
8	4.42	13.45	113.21	13.56
9	4.16	13.83	129.99	8.23
10	4.10	13.42	121.37	2.95

* น้ำหนักเซลล์แห้ง เป็นน้ำหนักเซลล์แห้งของเซลล์อิสระที่เกิดขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ



<u>รูปที่ 6</u> เปรียบเทียบการผลิตกรดมะนาว โดยการใช้เชื้อ *C. oleophila* C-73 ที่ตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต เมื่ออัตราส่วนเซลล์ต่อแคลเซียมอัลจิเนตเป็น 1:15, 1:25, 1:35 และ 1:45 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที

โดยที่ △ อัตราส่วนเซลล์ต่อแคลเซียมอัลจิเนตเท่ากับ 1:15

■ อัตราส่วนเซลล์ต่อแคลเซียมอัลจิเนตเท่ากับ 1:25

○ อัตราส่วนเซลล์ต่อแคลเซียมอัลจิเนตเท่ากับ 1:35

● อัตราส่วนเซลล์ต่อแคลเซียมอัลจิเนตเท่ากับ 1:45

น้อย โดยอัตราส่วนของเซลล์ต่อแคลเซียมอัลจิเนตเป็น 1:15 และ 1:25 ปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้สูงสุดเท่ากับ 131.02 และ 135.60 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 8 ของการหมัก และเมื่อใช้อัตราส่วนของเซลล์ต่อแคลเซียมอัลจิเนตเป็น 1:35 และ 1:45 ปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้สูงสุดเท่ากับ 136.56 และ 129.99 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 9 ของการหมัก จะเห็นว่าเมื่อใช้อัตราส่วนของเซลล์ต่อแคลเซียมอัลจิเนตเท่ากับ 1:35 ปริมาณกรดมะนาวที่ได้มีค่าใกล้เคียงกับเมื่อใช้อัตราส่วนของเซลล์ต่อแคลเซียมอัลจิเนตเท่ากับ 1:25 แต่ใช้เวลาในการหมักนานกว่า ดังนั้นเพื่อให้ได้ปริมาณกรดมะนาวสูงและใช้เวลาการหมักน้อยจึงเลือกอัตราส่วนของเซลล์ต่อแคลเซียมอัลจิเนตเท่ากับ 1:25 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ในการเตรียมเซลล์ตรึงของเชื้อ *C. oleophila* C-73 เพื่อผลิตกรดมะนาวในการทดลองต่อไป

3. <u>ขนาดของเซลล์ตรึงที่เหมาะสม</u>

Horitsu และคณะ (1988) พบว่าเซลล์ตรึงที่มีขนาดเล็กผลิตกรดมะนาวได้สูงกว่าเซลล์ตรึงขนาดใหญ่ ดังนั้นการทดลองนี้จึงแปรผันขนาดของเซลล์ตรึงที่ใช้ โดยเตรียมเซลล์ตรึงของเชื้อ *C. oleophila* C-73 ด้วยแคลเซียมอัลจิเนต ให้มีขนาดของเม็ดเซลล์ตรึงต่างกัน 3 ขนาดคือ S,M และ L โดยมีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของเซลล์ตรึง(วัดโดยใช้ Vernier calipper)เท่ากับ 0.369,0.441 และ 0.570 เซนติเมตร ตามลำดับ (ภาคผนวก ง) เมื่อนำเซลล์ตรึงที่ได้เลี้ยงในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาว เก็บตัวอย่างทุก 1 วัน

ผลการทดลองดังในตารางที่ 6ก,6ข,6ค และรูปที่ 7 พบว่า เมื่อใช้เซลล์ตรึงขนาด S และ M ปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้สูงสุดมีค่าใกล้เคียงกันคือ 136.84 และ 135.60 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในวันที่ 8 ของการหมัก มีอัตราการผลิตกรดมะนาวใกล้เคียงกันประมาณ 22.08 กรัมต่อลิตรต่อวันในขณะที่การใช้เซลล์ตรึงขนาด L ซึ่งขนาดใหญ่กว่า ปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้สูงสุดต่ำกว่าเล็กน้อยเท่ากับ 131.94 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 10 ของการหมักตามลำดับ และมีอัตราการผลิตกรดมะนาวช้ากว่าคือประมาณ 16.56 กรัมต่อลิตรต่อวัน ดังนั้นการทดลองต่อไปจะใช้เซลล์ตรึงขนาดประมาณ 0.3-0.4 เซนติเมตร ในการตรึงเซลล์ *C. oleophila* C-73 ด้วยแคลเซียมอัลจิเนต เพื่อผลิตกรดมะนาว

ตารางที่ 6ก การผลิตกรดมะนาว โดยการใช้เซลล์ตรึงของเชื้อ *C. oleophila* C-73 ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 0.369 เซนติเมตร ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที

เวลา (วัน)	ความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง* (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณกรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ (กรัมต่อลิตร)
0	6.85	0.00	0.00	200.05
1	6.84	3.70	0.61	192.38
2	6.71	9.18	8.21	170.45
3	6.46	10.78	23.68	151.89
4	6.13	11.98	44.45	122.35
5	5.56	12.57	63.02	101.22
6	5.38	13.06	92.42	55.29
7	4.28	14.38	125.37	18.36
8	4.13	15.76	136.84	6.99
9	4.10	15.23	136.85	3.95
10	4.08	14.72	132.66	1.41

* น้ำหนักเซลล์แห้ง เป็นน้ำหนักเซลล์แห้งของเซลล์อิสระที่เกิดขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ

ตารางที่ 6ข การผลิตกรดมะนาว โดยการใช้เซลล์ตรึงของเชื้อ *C. oleophila* C-73 ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 0.441 เซนติเมตร ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที

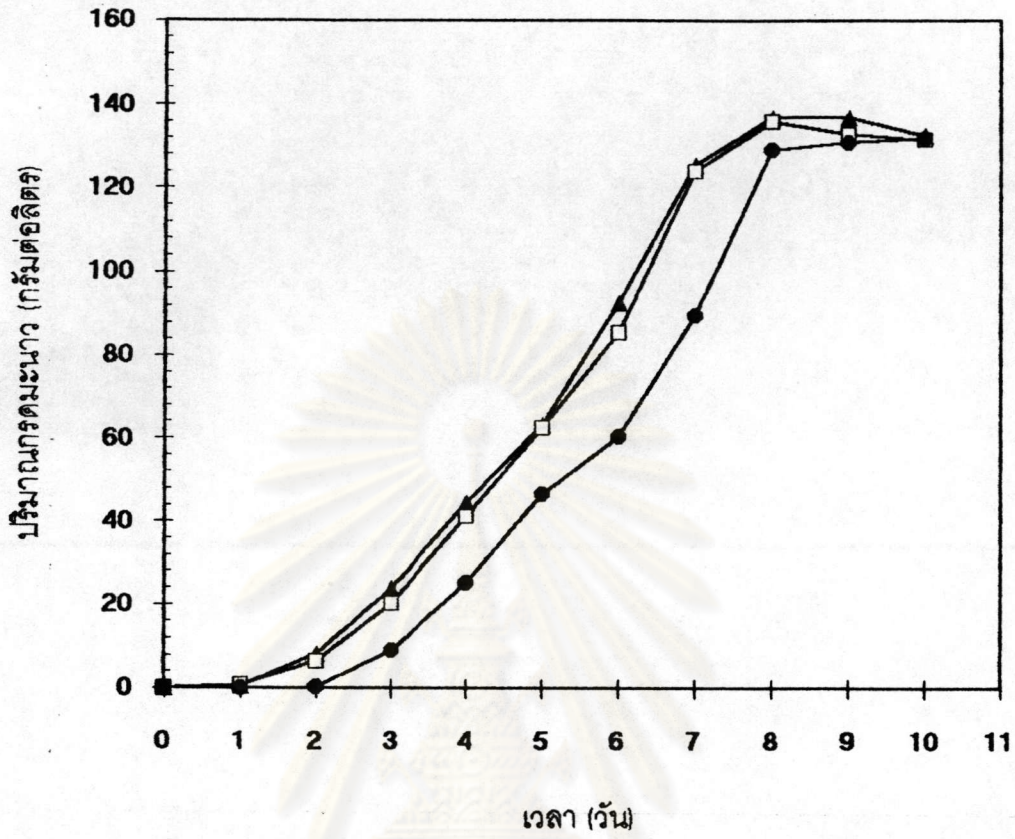
เวลา (วัน)	ความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง* (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณกรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ (กรัมต่อลิตร)
0	6.87	0.00	0.00	204.68
1	6.80	3.75	0.84	190.46
2	6.71	6.72	6.26	176.65
3	6.47	10.62	20.14	150.30
4	6.13	11.85	41.26	121.06
5	5.54	12.46	62.30	96.75
6	5.49	13.16	85.45	60.65
7	4.26	13.44	124.02	22.68
8	4.15	14.25	135.60	6.86
9	4.09	13.64	130.78	3.20
10	3.98	13.42	131.65	1.76

* น้ำหนักเซลล์แห้ง เป็นน้ำหนักเซลล์แห้งของเซลล์อิสระที่เกิดขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ

ตารางที่ 6ค การผลิตกรดมะนาว โดยการใช้เซลล์ตรึงของเชื้อ *C. oleophila* C-73 ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 0.570 เซนติเมตร ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที

เวลา (วัน)	ความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง* (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณกรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ (กรัมต่อลิตร)
0	6.80	0.00	0.00	200.05
1	6.77	2.02	0.00	199.10
2	6.70	4.92	0.15	190.75
3	6.55	9.40	8.97	169.04
4	6.44	11.10	24.93	143.52
5	6.07	12.44	46.54	111.25
6	5.53	12.84	60.19	99.38
7	5.41	13.61	89.38	53.47
8	4.18	13.75	128.90	10.32
9	4.13	14.16	130.72	9.72
10	4.10	14.58	131.94	8.38

* น้ำหนักเซลล์แห้ง เป็นน้ำหนักเซลล์แห้งของเซลล์อิสระที่เกิดขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ



รูปที่ 7 เปรียบเทียบการผลิตกรดมะนาว โดยการใช้เซลล์ตรึงของเชื้อ *C. oleophila* C-73 ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.369, 0.441 และ 0.570 เซนติเมตร ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที

โดยที่ ▲ เซลล์ตรึงขนาด 0.369 เซนติเมตร

□ เซลล์ตรึงขนาด 0.441 เซนติเมตร

● เซลล์ตรึงขนาด 0.570 เซนติเมตร

4. ความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ที่เหมาะสม

เตรียมเซลล์ตรึงของเชื้อ *C. oleophila* C-73 ด้วยแคลเซียมอัลจิเนต โดยแปรผันความเข้มข้นของสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ที่ใช้ในการเตรียมเซลล์ตรึง เป็น 0.25, 0.50 และ 0.75 โมลาร์ เมื่อนำเซลล์ตรึงที่ได้ไปเลี้ยงในอาหารเพื่อการผลิตกรดมะนาว เก็บตัวอย่างทุก 1 วัน ผลการทดลองในตารางที่ 7ก,7ข,7ค และรูปที่ 8 พบว่าเมื่อใช้ความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ 0.25,0.50 และ 0.75 โมลาร์ ในการเตรียมเซลล์ตรึง ไม่มีผลต่อการผลิตกรดมะนาวของเชื้อ *C.oleophila* C-73 ที่ตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต โดยให้ปริมาณกรดมะนาว ในวันที่ 8 ของการหมัก ใกล้เคียงกันเท่ากับ 136.80,136.84 และ 135.94 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และมีอัตราการผลิตกรดมะนาวใกล้เคียงกันประมาณ 26.64 กรัมต่อลิตรต่อวัน ดังนั้นการทดลองต่อไปจะใช้ความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์เท่ากับ 0.25 โมลาร์ ก็เพียงพอสำหรับการเตรียมเซลล์ตรึงของเชื้อ *C. oleophila* C-73 บนแคลเซียมอัลจิเนตเพื่อผลิตกรดมะนาว

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาว โดยการใช้เซลล์ตรึงของเชื้อ *C. oleophila* C-73

1. ปริมาณเซลล์เริ่มต้นที่เหมาะสม

เตรียมเซลล์ตรึงของเชื้อ *C. oleophila* C-73 ด้วยแคลเซียมอัลจิเนต นำเซลล์ตรึงที่ได้มาเลี้ยงในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาว แปรผันปริมาณเซลล์ตรึงเริ่มต้นเป็น 0.4,0.8 และ 1.2 กรัม (น้ำหนักเซลล์แห้ง) ต่อลิตร คิดเป็น 10,20 และ 30 กรัม (น้ำหนักเซลล์ตรึง) ต่อลิตร ตามลำดับ เก็บตัวอย่างทุก 1 วัน ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 8ก,8ข,8ค และรูปที่ 9 พบว่าเมื่อปริมาณเซลล์เริ่มต้นเป็น 10, 20 และ 30 กรัม (น้ำหนักเซลล์ตรึง) ต่อลิตร การเจริญมีค่าเพิ่มขึ้น แต่ปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้สูงสุดใกล้เคียงกันคือ 136.80,136.94 และ 137.63 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในเวลา 8 วันของการหมัก และมีอัตราการผลิตกรดมะนาวใกล้เคียงกันประมาณ 26.64 กรัมต่อลิตรต่อวัน ดังนั้นปริมาณเซลล์ตรึงเริ่มต้นเท่ากับ 10 กรัม (น้ำหนักเซลล์ตรึง) ต่อลิตร ก็เพียงพอสำหรับการผลิตกรดมะนาวโดยใช้เซลล์ตรึงของเชื้อ *C. oleophila* C-73

ตารางที่ 7ก การผลิตกรดมะนาว โดยการใช้เชื้อ *C. oleophila* C-73 ที่ตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต เมื่อใช้ความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์เท่ากับ 0.25 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที

เวลา (วัน)	ความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง* (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณกรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ (กรัมต่อลิตร)
0	6.83	0.00	0.00	207.30
1	6.80	3.54	0.59	194.64
2	6.72	8.80	7.26	172.86
3	6.45	10.72	22.19	150.54
4	6.04	11.86	37.70	112.15
5	5.49	12.22	71.74	82.86
6	5.38	13.24	96.06	54.78
7	4.17	14.52	127.16	16.60
8	4.14	15.61	136.80	9.44
9	4.10	15.37	135.61	3.85
10	3.97	13.74	133.82	0.94

* น้ำหนักเซลล์แห้ง เป็นน้ำหนักเซลล์แห้งของเซลล์อิสระที่เกิดขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ

ตารางที่ 7ข การผลิตกรดมะนาว โดยการใช้เชื้อ *C. oleophila* C-73 ที่ตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต เมื่อใช้ความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์เท่ากับ 0.50 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที

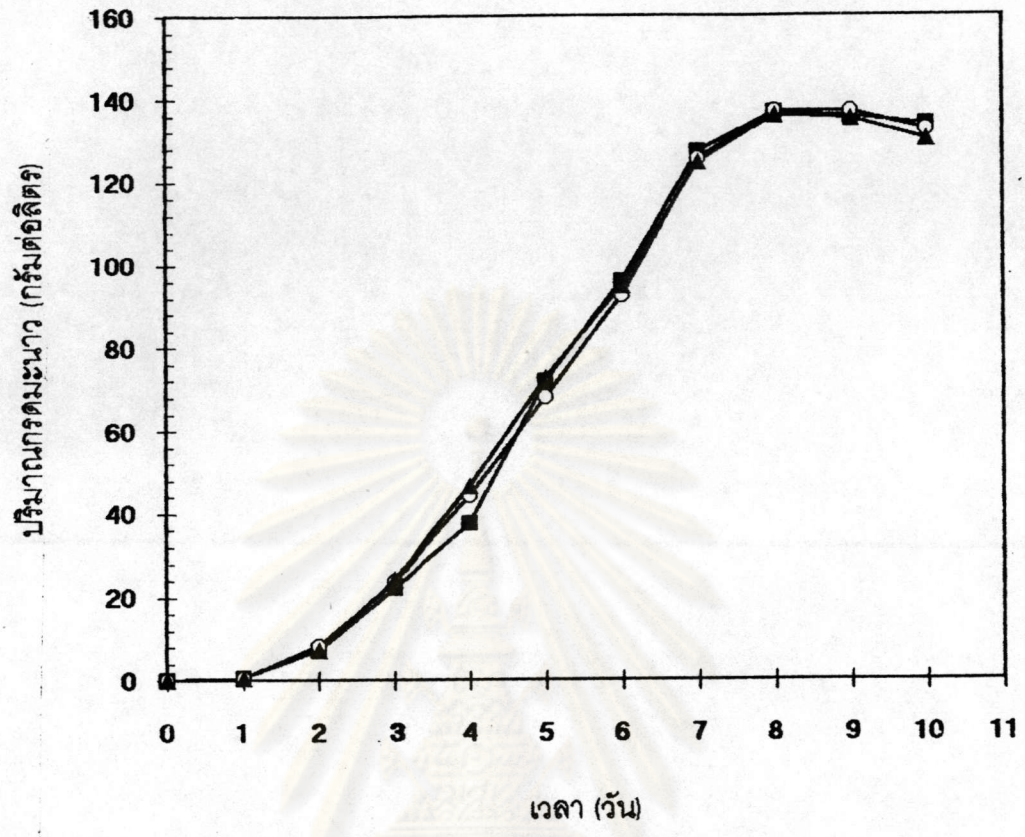
เวลา (วัน)	ความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง* (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณกรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ (กรัมต่อลิตร)
0	6.85	0.00	0.00	200.05
1	6.84	3.70	0.61	192.38
2	6.71	9.18	8.21	170.45
3	6.46	10.78	23.68	151.89
4	6.13	11.98	44.45	122.35
5	5.56	12.57	63.02	101.22
6	5.38	13.06	92.42	55.29
7	4.28	14.38	125.37	18.36
8	4.13	15.76	136.84	6.99
9	4.10	15.23	136.85	3.95
10	4.08	14.72	132.66	1.41

* น้ำหนักเซลล์แห้ง เป็นน้ำหนักเซลล์แห้งของเซลล์อิสระที่เกิดขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ

ตารางที่ 7ค การผลิตกรดมะนาว โดยการใช้เชื้อ *C. oleophila* C-73 ที่ตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต เมื่อใช้ความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์เท่ากับ 0.75 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที

เวลา (วัน)	ความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง* (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณกรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ (กรัมต่อลิตร)
0	6.82	0.00	0.00	204.05
1	6.79	3.42	0.64	193.82
2	6.60	9.92	7.42	173.65
3	6.43	10.20	24.18	146.10
4	6.04	11.01	46.65	114.48
5	5.49	11.96	72.54	80.61
6	5.38	12.43	94.80	56.67
7	4.19	12.95	124.65	17.65
8	4.16	13.98	135.94	8.42
9	4.13	14.26	135.16	1.68
10	4.01	14.10	130.25	0.12

* น้ำหนักเซลล์แห้ง เป็นน้ำหนักเซลล์แห้งของเซลล์อิสระที่เกิดขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ



รูปที่ 8 เปรียบเทียบการผลิตกรดมะนาว โดยการใช้เชื้อ *C. oleophila* C-73 ที่ตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต เมื่อใช้ความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ 0.25, 0.50 และ 0.75 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที

โดยที่ ■ ความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ 0.25 โมลาร์

○ ความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ 0.50 โมลาร์

▲ ความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ 0.75 โมลาร์

ตารางที่ 8ก การผลิตกรดมะนาว โดยการใช้เซลล์ตรึงของเชื้อ *C. oleophila* C-73 ปริมาณเริ่มต้น 10 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที

เวลา (วัน)	ความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง* (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณกรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ (กรัมต่อลิตร)
0	6.83	0.00	0.00	207.30
1	6.80	3.54	0.59	194.64
2	6.72	8.80	7.26	172.86
3	6.45	10.72	22.19	150.54
4	6.04	11.86	37.70	112.15
5	5.49	12.22	71.74	82.86
6	5.38	13.24	96.06	54.78
7	4.17	14.52	127.16	16.60
8	4.14	15.61	136.80	9.44
9	4.10	15.37	135.61	3.85
10	3.97	13.74	133.82	0.94

* น้ำหนักเซลล์แห้ง เป็นน้ำหนักเซลล์แห้งของเซลล์อิสระที่เกิดขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ

ตารางที่ 8ข การผลิตกรดมะนาว โดยการใช้เซลล์ตรึงของเชื้อ *C. oleophila* C-73 ปริมาณเริ่มต้น 20 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที

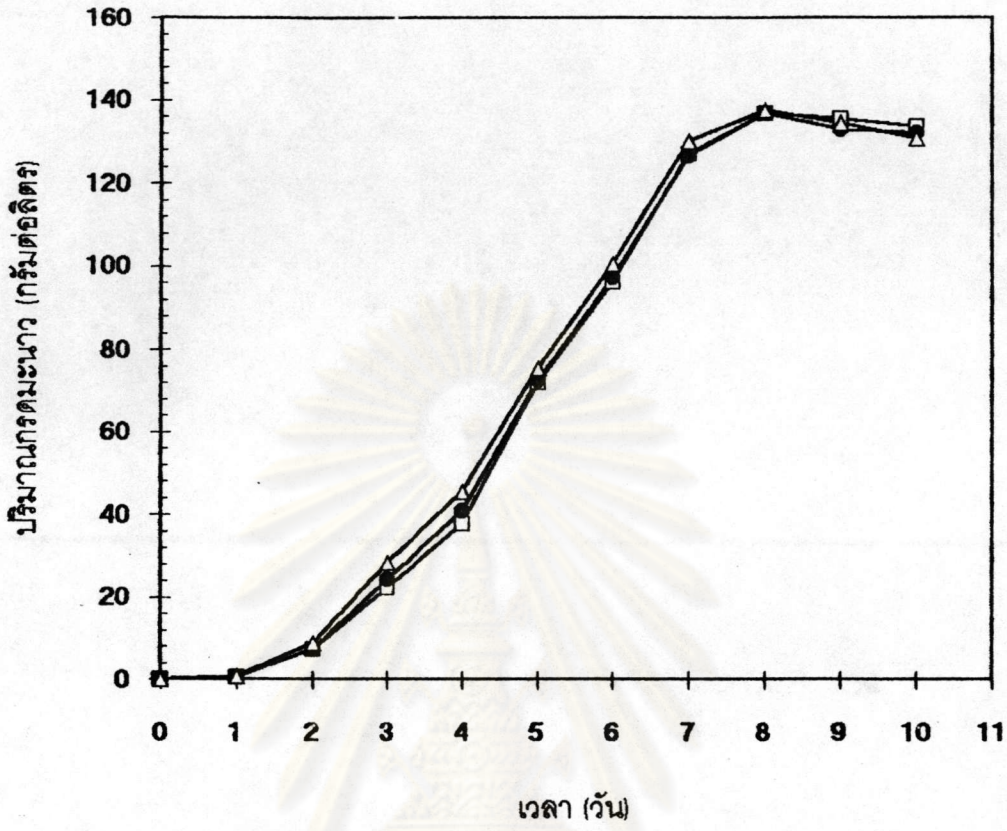
เวลา (วัน)	ความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง* (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณกรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ (กรัมต่อลิตร)
0	6.83	0.00	0.00	207.30
1	6.80	4.44	0.62	187.36
2	6.63	9.14	7.45	169.25
3	6.43	11.14	24.47	141.54
4	6.12	11.98	40.91	112.17
5	5.49	13.75	72.31	80.45
6	5.39	14.57	97.03	56.24
7	4.17	15.71	129.49	15.09
8	4.15	16.07	136.94	6.84
9	4.10	15.58	133.04	2.08
10	4.07	15.32	132.12	0.94

* น้ำหนักเซลล์แห้ง เป็นน้ำหนักเซลล์แห้งของเซลล์อิสระที่เกิดขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ

ตารางที่ 8ค การผลิตกรดมะนาว โดยการใช้เซลล์ตรึงของเชื้อ *C. oleophila* C-73 ปริมาณเริ่มต้น 20 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที

เวลา (วัน)	ความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง* (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณกรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ (กรัมต่อลิตร)
0	6.83	0.00	0.00	202.54
1	6.81	5.48	0.94	184.18
2	6.62	9.12	8.99	164.66
3	6.41	11.98	28.51	133.26
4	6.07	12.30	45.43	106.78
5	5.48	13.77	75.35	78.41
6	5.21	15.47	100.43	46.75
7	5.17	16.62	130.14	14.92
8	4.13	17.06	137.63	3.68
9	4.09	16.73	134.46	1.57
10	3.98	15.59	131.03	0.82

* น้ำหนักเซลล์แห้ง เป็นน้ำหนักเซลล์แห้งของเซลล์อิสระที่เกิดขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ



รูปที่ 9 เปรียบเทียบการผลิตกรดมะนาว โดยการใช้เซลล์ตรึงของเชื้อ *C. oleophila* C-73 ปริมาณเริ่มต้น 10,20 และ 30 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที

โดยที่ □ เซลล์ตรึงเริ่มต้น 10 กรัมต่อลิตร

● เซลล์ตรึงเริ่มต้น 20 กรัมต่อลิตร

△ เซลล์ตรึงเริ่มต้น 30 กรัมต่อลิตร

2. ปริมาณกลูโคสเริ่มต้นที่เหมาะสม

Rymowicz และคณะ (1993) รายงานผลของปริมาณกลูโคสเริ่มต้นที่มีต่อการผลิตกรดมะนาวของเซลล์ตรึงของเชื้อ *Y. lipolytica* A-101 ดังนั้นการทดลองนี้จึงแปรผันปริมาณกลูโคส เพื่อหาปริมาณกลูโคสที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาวของเซลล์ตรึง โดยนำเซลล์ตรึงของเชื้อ *C. oleophila* C-73 ที่ตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต ไปเลี้ยงในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาว ที่แปรผันปริมาณกลูโคสเริ่มต้นเป็น 180, 200, 220 และ 250 กรัมต่อลิตร เก็บตัวอย่างทุก 1 วัน

ผลการทดลองในตารางที่ 9ก,9ข,9ค,9ง และรูปที่ 10 พบว่า การผลิตกรดมะนาวโดยการใช้เซลล์ตรึงของเชื้อ *C.oleophila* C-73 เมื่อปริมาณกลูโคสเท่ากับ 180 กรัมต่อลิตร มีอัตราการผลิตกรดมะนาวประมาณ 36.00 กรัมต่อลิตรต่อวัน ผลิตกรดมะนาวได้ 124.47 กรัมต่อลิตร ในเวลา 7 วันของการหมัก เมื่อปริมาณกลูโคสเพิ่มขึ้นเท่ากับ 200 กรัมต่อลิตร อัตราการผลิตกรดมะนาวประมาณ 28.56 กรัมต่อลิตรต่อวัน ปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้สูงสุดเท่ากับ 136.73 กรัมต่อลิตร ในเวลา 8 วันของการหมัก แต่เมื่อเพิ่มปริมาณกลูโคสเป็น 220 และ 250 กรัมต่อลิตร ปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้ ในวันที่ 8 ของการหมักลดลงเท่ากับ 128.96 และ 101.34 กรัมต่อลิตร และมีอัตราการผลิตกรดมะนาวช้าลงประมาณ 27.36 และ 20.64 กรัมต่อลิตรต่อวัน ตามลำดับ เมื่อคิดผลผลิตกรดมะนาวที่ได้เทียบกับปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ที่ใช้ไปเท่ากับ ร้อยละ 69.92, 67.36 และ 61.42 เมื่อปริมาณกลูโคสเริ่มต้นเป็น 200, 220 และ 250 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ จะเห็นว่าเมื่อเพิ่มปริมาณกลูโคสเริ่มต้น น้ำตาลรีดิวส์เหลือในน้ำหมักมากขึ้น อัตราการผลิตกรดมะนาวช้าลงและผลผลิตกรดมะนาวลดลง ดังนั้นปริมาณกลูโคสเริ่มต้น 200 กรัมต่อลิตร จึงเป็นปริมาณที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาว โดยการใช้เซลล์ตรึงของเชื้อ *C.oleophila* C-73

3. อายุของเซลล์ยีสต์ที่เหมาะสม

ประเสริฐ (2537) พบว่าเชื้อยีสต์ *C. oleophila* C-73 ที่มีอายุการเจริญในอาหารสำหรับการเจริญเติบโตในช่วงกลาง, ช่วงปลาย หรือช่วงการเจริญเติบโตคงที่ มีความสามารถในการผลิตกรดมะนาวใกล้เคียงกัน ดังนั้นการทดลองนี้จะเตรียมเซลล์

ตารางที่ 9ก การผลิตกรดมะนาว โดยการใช้เซลล์ตรึงของเชื้อ *C. oleophila* C-73 เมื่อปริมาณกลูโคสเริ่มต้น 180 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที

เวลา (วัน)	ความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง* (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณกรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ (กรัมต่อลิตร)
0	6.88	0.00	0.00	179.24
1	6.79	3.62	2.56	168.75
2	6.53	5.98	13.42	134.86
3	6.35	7.92	31.75	108.27
4	5.97	10.95	50.68	85.43
5	5.43	11.82	82.40	51.02
6	4.49	12.30	113.33	13.75
7	4.18	12.81	124.47	4.61
8	4.12	12.07	124.32	0.21
9	4.09	12.02	123.32	0.00

* น้ำหนักเซลล์แห้ง เป็นน้ำหนักเซลล์แห้งของเซลล์อิสระที่เกิดขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ

ตารางที่ 9ข การผลิตกรดมะนาว โดยการใช้เซลล์ตรึงของเชื้อ *C. oleophila* C-73 เมื่อปริมาณกลูโคสเริ่มต้น 200 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที

เวลา (วัน)	ความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง* (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณกรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ (กรัมต่อลิตร)
0	6.85	0.00	0.00	204.00
1	6.79	4.38	0.67	192.67
2	6.71	9.21	6.28	174.82
3	6.52	10.25	17.84	140.24
4	6.20	12.14	36.25	129.80
5	5.49	12.58	72.43	94.81
6	5.22	13.61	99.01	57.60
7	4.17	14.98	125.46	19.87
8	4.14	15.52	136.73	4.45
9	3.99	15.31	136.44	0.12
10	3.57	14.94	126.27	0.00

* น้ำหนักเซลล์แห้ง เป็นน้ำหนักเซลล์แห้งของเซลล์อิสระที่เกิดขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ

ตารางที่ 9ค การผลิตกรดมะนาว โดยการใช้เซลล์ตรึงของเชื้อ *C. oleophila* C-73 เมื่อปริมาณกลูโคสเริ่มต้น 220 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที

เวลา (วัน)	ความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง* (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณกรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ (กรัมต่อลิตร)
0	6.65	0.00	0.00	227.30
1	6.60	3.25	0.22	212.45
2	6.54	8.66	3.02	204.42
3	6.49	10.75	10.82	167.53
4	6.22	11.56	34.74	143.74
5	5.54	11.60	62.82	113.80
6	5.41	12.48	88.22	79.11
7	5.20	14.46	122.30	33.48
8	4.17	15.24	128.96	28.56
9	4.15	16.28	132.80	18.02
10	4.12	16.84	134.13	12.27

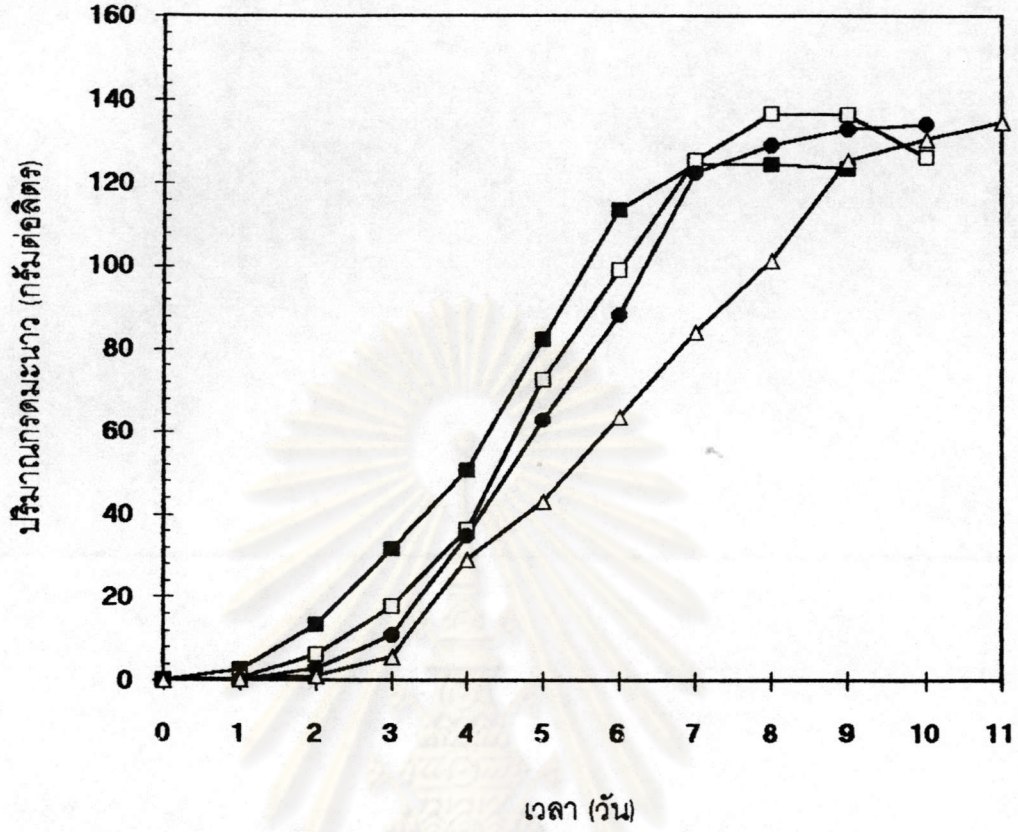
* น้ำหนักเซลล์แห้ง เป็นน้ำหนักเซลล์แห้งของเซลล์อิสระที่เกิดขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ

ทอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 9ง การผลิตกรดมะนาว โดยการใช้เซลล์ตรึงของเชื้อ *C. oleophila* C-73 เมื่อปริมาณกลูโคสเริ่มต้น 250 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที

เวลา (วัน)	ความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง* (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณกรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ (กรัมต่อลิตร)
0	6.22	0.00	0.00	259.20
1	6.20	2.26	0.32	246.00
2	6.16	7.50	1.06	234.48
3	5.90	7.88	5.62	225.65
4	5.82	9.78	25.23	187.42
5	5.75	10.82	43.25	165.31
6	5.53	11.28	63.60	125.51
7	5.42	13.06	83.95	106.95
8	5.20	14.42	101.34	84.95
9	4.17	14.60	125.50	60.62
10	4.14	15.10	130.59	59.86
11	4.02	16.48	134.66	48.55

* น้ำหนักเซลล์แห้ง เป็นน้ำหนักเซลล์แห้งของเซลล์อิสระที่เกิดขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ



<u>รูปที่ 10</u> เปรียบเทียบการผลิตกรดมะนาว โดยการใช้เซลล์ตรึงของเชื้อ *C.oleophila* C-73 เมื่อแปรผันปริมาณกลูโคสเริ่มต้นเป็น 180,200,220 และ 250 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที

โดยที่ ■ ปริมาณกลูโคสเริ่มต้น 180 กรัมต่อลิตร

□ ปริมาณกลูโคสเริ่มต้น 200 กรัมต่อลิตร

● ปริมาณกลูโคสเริ่มต้น 220 กรัมต่อลิตร

△ ปริมาณกลูโคสเริ่มต้น 250 กรัมต่อลิตร

ตรึงของเชื้อ *C. oleophila* C-73 ที่แปรผันอายุของเซลล์ยีสต์ในอาหารสำหรับการเจริญเติบโต เพื่อนำมาใช้ในการตรึงเซลล์ โดยเลี้ยงในอาหารสำหรับการเจริญเติบโตในช่วงกลางของระยะทวีคูณ (15ชั่วโมง),ช่วงปลายของระยะทวีคูณ (21 ชั่วโมง) และช่วงระยะการเจริญคงที่ (24 ชั่วโมง) นำเซลล์ตรึงที่ได้ไปเลี้ยงในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาว เก็บตัวอย่างทุก 1 วัน

ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 10ก,10ข,10ค และรูปที่ 11 พบว่า อายุของเซลล์ยีสต์ที่ใช้ในการตรึง ไม่มีผลต่อการผลิตกรดมะนาวของเซลล์ตรึง โดยให้ปริมาณกรดมะนาวใกล้เคียงกันเท่ากับ 136.73, 137.77 และ 138.21 กรัมต่อลิตรในเวลา 8 วันของการหมัก เมื่อใช้เซลล์ยีสต์ที่มีอายุในอาหารสำหรับการเจริญเติบโตเท่ากับ 15, 21 และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ และมีอัตราการผลิตกรดมะนาวใกล้เคียงกับประมาณ 28.08 กรัมต่อลิตรต่อวัน แต่เพื่อลดปริมาณการเตรียมอาหารสำหรับการเจริญเติบโต และให้ได้ปริมาณเซลล์ยีสต์มากสุดเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารสำหรับการเจริญเติบโต จึงเลือกใช้เซลล์ยีสต์ที่มีอายุ 21 ชั่วโมง เนื่องจากมีปริมาณเซลล์ในอาหารสำหรับการเจริญเติบโต (6.0 กรัมต่อลิตร) สูงกว่าที่อายุ 15 ชั่วโมง (4.0 กรัมต่อลิตร) และไม่จำเป็นต้องใช้เวลานานถึง 24 ชั่วโมง ดังนั้นเวลา 21 ชั่วโมงหรือช่วงปลายของระยะทวีคูณจึงเป็นเวลาที่เหมาะสม สำหรับการนำเซลล์ยีสต์ที่เลี้ยงในอาหารสำหรับการเจริญเติบโตมาทำการตรึงเซลล์เพื่อผลิตกรดมะนาว

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 10ก การผลิตกรดมะนาว โดยการใช้เชื้อ *C. oleophila* C-73 อายุ 15 ชั่วโมง ในการตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที

เวลา (วัน)	ความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง* (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณกรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ (กรัมต่อลิตร)
0	6.85	0.00	0.00	204.00
1	6.79	4.38	0.67	192.67
2	6.71	9.21	6.28	174.82
3	6.52	10.25	17.84	140.24
4	6.20	12.14	36.25	129.80
5	5.49	12.58	72.43	94.81
6	5.22	13.61	99.01	57.60
7	4.17	14.98	125.46	19.87
8	4.14	15.52	136.73	4.45
9	3.99	15.31	136.44	0.12
10	3.57	14.94	126.27	0.00

* น้ำหนักเซลล์แห้ง เป็นน้ำหนักเซลล์แห้งของเซลล์อิสระที่เกิดขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ

ตารางที่ 10ข การผลิตกรดมะนาว โดยการใช้เชื้อ *C. oleophila* C-73 อายุ 21 ชั่วโมง ในการตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที

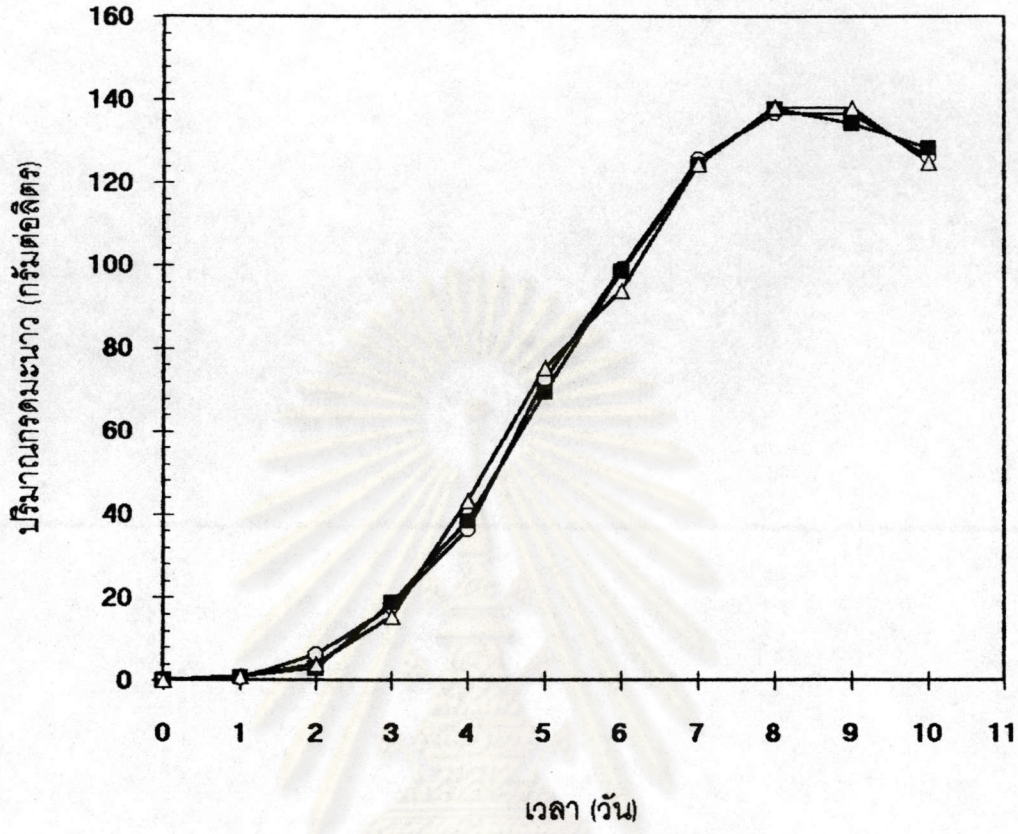
เวลา (วัน)	ความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง* (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณกรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ (กรัมต่อลิตร)
0	6.84	0.00	0.00	204.42
1	6.79	4.33	0.98	188.25
2	6.76	8.56	2.89	174.20
3	6.56	10.87	18.89	155.21
4	6.20	11.53	38.29	112.78
5	5.50	12.13	69.49	91.43
6	5.26	14.62	98.42	49.25
7	4.21	15.45	124.08	18.71
8	4.10	16.10	137.77	2.42
9	3.96	16.06	134.03	0.73
10	3.64	15.49	128.20	0.00

* น้ำหนักเซลล์แห้ง เป็นน้ำหนักเซลล์แห้งของเซลล์อิสระที่เกิดขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ

ตารางที่ 10ค การผลิตกรดมะนาว โดยการใช้เชื้อ *C. oleophila* C-73 อายุ 24 ชั่วโมง ในการตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที

เวลา (วัน)	ความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง* (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณกรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ (กรัมต่อลิตร)
0	6.85	0.00	0.00	205.40
1	6.80	3.06	1.08	189.42
2	6.77	8.45	3.85	167.04
3	6.50	11.02	15.42	152.41
4	6.07	12.10	43.26	109.64
5	5.48	13.60	75.28	75.53
6	5.25	14.36	90.90	56.35
7	4.16	15.77	124.37	10.72
8	4.10	15.97	138.21	5.18
9	4.03	15.62	138.04	0.44
10	3.72	15.58	124.80	0.00

* น้ำหนักเซลล์แห้ง เป็นน้ำหนักเซลล์แห้งของเซลล์อิสระที่เกิดขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ



รูปที่ 11 เปรียบเทียบการผลิตกรดมะนาว โดยการใช้เซลล์ตรึงของเชื้อ *C. oleophila* C-73 เมื่ออายุของเชื้อที่ใช้ในการตรึงเป็น 15, 21 และ 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที

โดยที่ ■ อายุ 15 ชั่วโมง
○ อายุ 21 ชั่วโมง
△ อายุ 24 ชั่วโมง

การศึกษาการผลิตกรดมะนาว โดยการใช้เซลล์ตรึงของเชื้อ *C. oleophila* C-73 เปรียบเทียบกับเซลล์ยีสต์อิสระ ในระดับขวดเขย่า

การใช้เซลล์ตรึงของเชื้อ *C. oleophila* C-73 เพื่อผลิตกรดมะนาว ทำได้โดยการเลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับการเจริญเติบโต ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที เป็นเวลา 21 ชั่วโมง นำเซลล์ยีสต์ที่ได้มาตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต โดยใช้เซลล์ 1.0 กรัม (น้ำหนักเซลล์แห้ง) ผสมกับโซเดียมแคลเซียมอัลจิเนตที่มีความเข้มข้น 4 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 25 มิลลิลิตร หยดลงบนสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.25 โมลาร์ เตรียมเซลล์ตรึงที่มีขนาดประมาณ 0.3-0.4 เซนติเมตร นำเซลล์ตรึงที่ได้มาผลิตกรดมะนาวโดยให้มีน้ำหนักเซลล์ตรึงเริ่มต้นเท่ากับ 10 กรัมต่อลิตร คิดเป็นน้ำหนักเซลล์แห้งของเซลล์อิสระเท่ากับ 0.4 กรัมต่อลิตร เปรียบเทียบการผลิตกรดมะนาวกับเซลล์ยีสต์อิสระได้โดยหลังจากเลี้ยงเชื้อในอาหารสำหรับการเจริญเติบโต 21 ชั่วโมงแล้ว นำเซลล์ที่ได้มาผลิตกรดมะนาว โดยมีน้ำหนักเซลล์แห้งเริ่มต้นเท่ากับ 0.4 กรัมต่อลิตรเช่นกัน เก็บตัวอย่างทุก 1 วัน

ผลการทดลองแสดงได้ดังตารางที่ 11,12 และรูปที่ 12 พบว่าเมื่อใช้เซลล์ตรึงและเซลล์อิสระในการผลิตกรดมะนาว ค่าความเป็นกรด-ด่างมีค่าลดลง เซลล์ยีสต์มีการใช้น้ำตาลในการเจริญและการผลิตกรดมะนาว เมื่อเวลาในการหมักนานขึ้น น้ำหนักเซลล์แห้งแสดงถึงการเจริญของเซลล์มีค่าเพิ่มขึ้น จนถึงวันที่ 7 ของการหมัก การใช้เซลล์อิสระการเจริญเริ่มช้ากว่าการใช้เซลล์ตรึง และมีปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้สูงสุดเท่ากับ 128.53 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 7 ของการหมัก มีอัตราการผลิตกรดมะนาวประมาณ 24.67 กรัมต่อลิตรต่อวัน ส่วนการใช้เซลล์ตรึงยังคงมีการเจริญจากน้ำหนักเซลล์แห้งในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เพิ่มขึ้น ประกอบกับมีเซลล์ในเซลล์ตรึงด้วย โดยมีปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้สูงสุดเท่ากับ 138.76 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 8 ของการหมัก มีอัตราการผลิตกรดมะนาวประมาณ 26.67 กรัมต่อลิตรต่อวัน

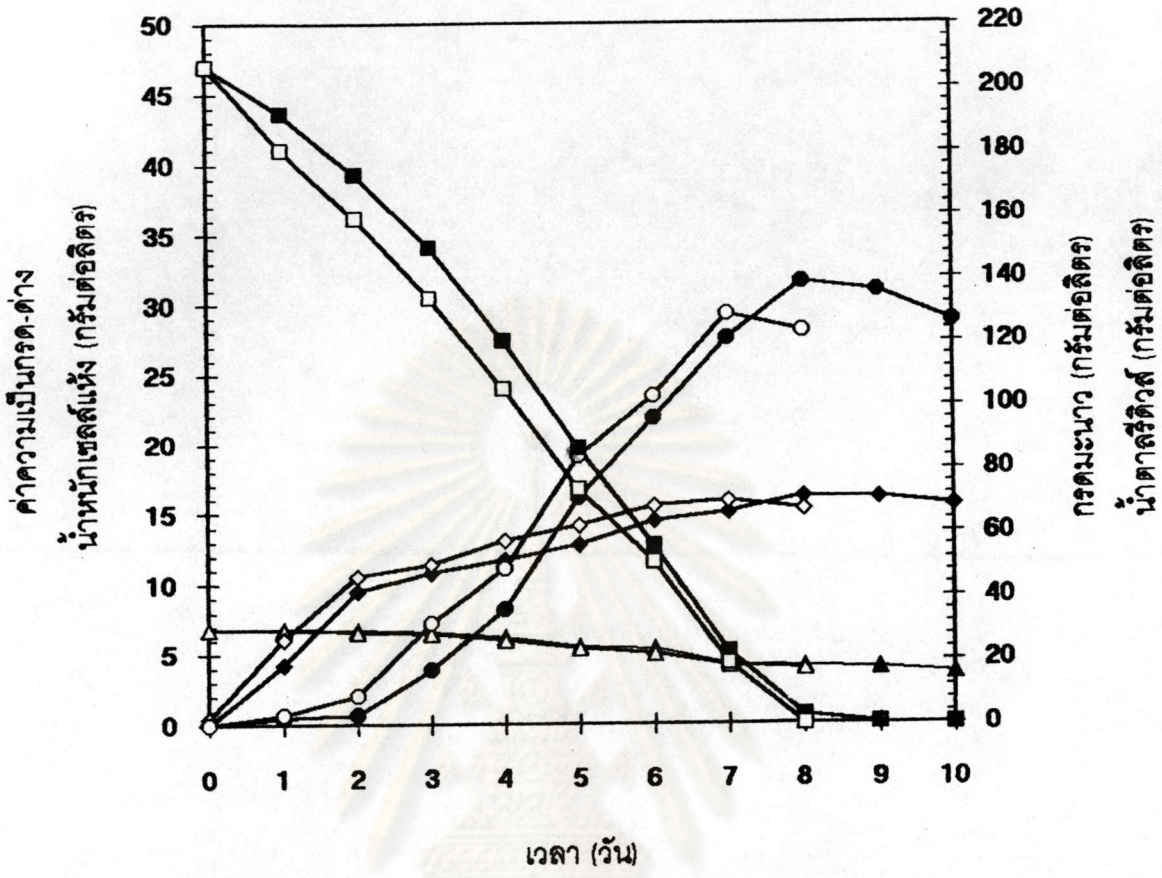
ตารางที่ 11 การผลิตกรดมะนาว โดยการใช้เชื้อ *C. oleophila* C-73 ที่ตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที

เวลา (วัน)	ความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง		ปริมาณกรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ (กรัมต่อลิตร)
		ในอาหารเลี้ยงเชื้อ (กรัมต่อลิตร)	ในเม็ดเซลล์ตรึง (กรัมต่อลิตร)		
0	6.84	0.00	0.40	0.00	209.64
1	6.79	4.26	0.50	1.06	191.85
2	6.75	9.52	0.54	6.81	172.86
3	6.56	10.75	0.51	16.84	149.76
4	6.20	11.68	0.48	36.09	120.34
5	5.50	12.78	0.41	70.72	86.58
6	5.37	14.41	0.40	95.89	55.62
7	4.21	15.05	0.39	121.06	22.78
8	4.06	16.15	0.40	138.76	2.62
9	3.98	16.08	0.39	136.02	0.26
10	3.63	15.58	0.40	126.46	0.00

ตารางที่ 12 การผลิตกรดมะนาว โดยการใช้เซลล์อิสระของเชื้อ *C.oleophila* C-73 ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที

เวลา (วัน)	ความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณกรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ (กรัมต่อลิตร)
0	6.84	0.40	0.00	206.60
1	6.77	6.03	3.06	180.45
2	6.59	10.58	10.94	159.17
3	6.45	11.42	31.63	136.74
4	6.01	13.04	48.88	105.36
5	5.41	14.10	84.03	73.36
6	4.99	15.47	102.96	50.82
7	4.17	15.84	128.53	18.85
8	3.96	15.24	123.47	0.00

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 12 เปรียบเทียบการผลิตกรดมะนาว โดยการใช้เซลล์ตรึงและเซลล์อิสระของเชื้อ *C. oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาว ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที

โดยที่ ● กรดมะนาว (เซลล์ตรึง)

○ กรดมะนาว (เซลล์อิสระ)

■ น้ำตาลรีดิวส์ (เซลล์ตรึง)

□ น้ำตาลรีดิวส์ (เซลล์อิสระ)

▲ ค่าความเป็นกรด-ด่าง (เซลล์ตรึง)

△ ค่าความเป็นกรด-ด่าง (เซลล์อิสระ)

◆ น้ำหนักเซลล์แห้ง (เซลล์ตรึง)

◇ น้ำหนักเซลล์แห้ง (เซลล์อิสระ)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

<u>การศึกษาผลของแคลเซียมคาร์บอเนตในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาว ที่มีต่อการผลิตกรดมะนาว โดยการใช้เซลล์ตรึงของเชื้อ *C. oleophila* C-73</u>

ในระหว่างการเลี้ยงเชื้อยีสต์เพื่อการผลิตกรดมะนาว การสะสมกรดทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่างมีค่าลดลงอย่างรวดเร็ว เกิดการเป็นพิษต่อเซลล์ยีสต์ได้ ดังนั้นมีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างให้คงที่ ในการทดลองระดับขวดเขย่า จะใช้แคลเซียมคาร์บอเนตเกรดที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ (lab grade) ซึ่งมีราคา 370 บาทต่อกิโลกรัม เพื่อเป็นแนวทางในการผลิตระดับขยายส่วน จึงทดลองเปลี่ยนชนิดของแคลเซียมคาร์บอเนตที่ใช้ เป็นเกรดที่ใช้ในระดับอุตสาหกรรม (industrial grade) ซึ่งมีราคาน้อยกว่าคือ 10 บาทต่อกิโลกรัม โดยการเลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* C-73 ที่ตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดมะนาวที่แปรผันปริมาณของแคลเซียมคาร์บอเนต เกรดระดับอุตสาหกรรมเป็น 80, 100, 120 และ 140 กรัมต่อลิตร เปรียบเทียบกับการใช้แคลเซียมคาร์บอเนต เกรดระดับห้องปฏิบัติการ ปริมาณ 100 กรัมต่อลิตร เก็บตัวอย่างในวันที่ 8 ของการหมัก

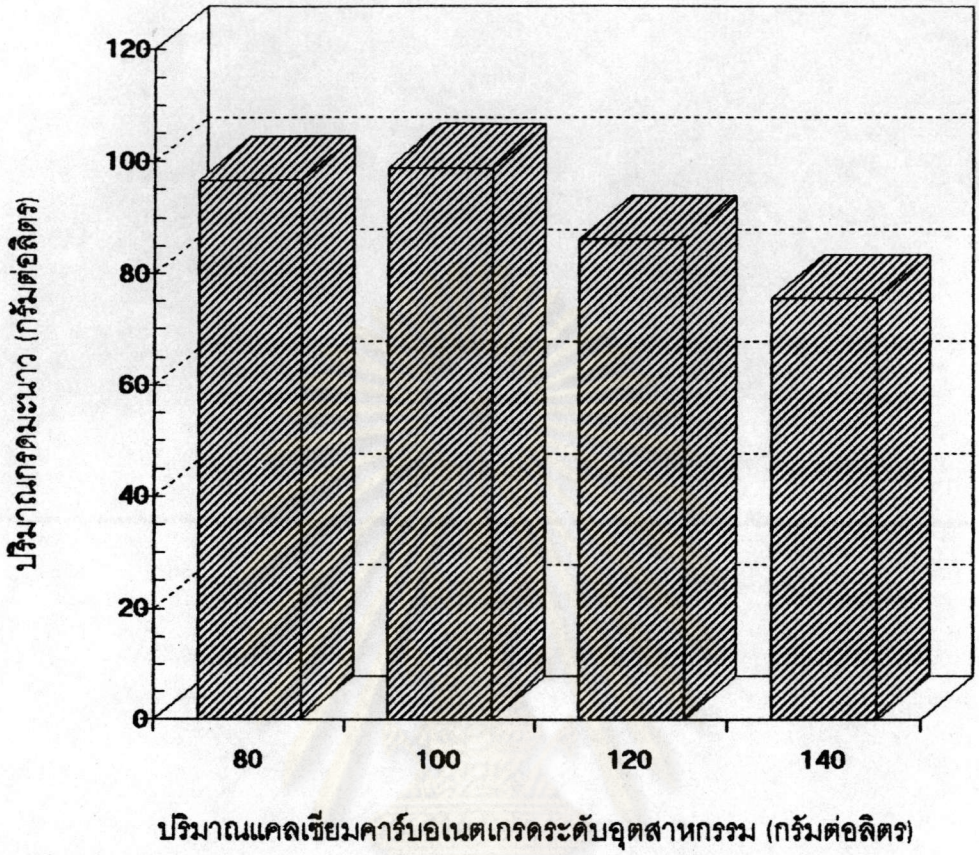
ผลการทดลองในตารางที่ 13 และรูปที่ 13 พบว่าเมื่อใช้แคลเซียมคาร์บอเนตเกรดระดับอุตสาหกรรมปริมาณ 80 และ 100 กรัมต่อลิตร ปริมาณกรดมะนาวที่ได้มีค่าเพิ่มขึ้นเท่ากับ 96.55 และ 98.79 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ แต่เมื่อเพิ่มปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตเป็น 120 และ 140 กรัมต่อลิตร ปริมาณกรดมะนาวที่ได้มีค่าลดลงคือ 86.07 และ 75.47 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ดังนั้นแคลเซียมคาร์บอเนตเกรดระดับอุตสาหกรรมปริมาณ 100 กรัมต่อลิตร จึงเหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาว และเมื่อเปรียบเทียบชนิดของแคลเซียมคาร์บอเนตที่ใช้ พบว่าเมื่อใช้เกรดระดับอุตสาหกรรมปริมาณกรดมะนาวที่ได้น้อยกว่าเมื่อใช้เกรดระดับห้องปฏิบัติการคือ 98.79 และ 138.76 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

ตารางที่ 13 การผลิตกรดมะนาว เมื่อใช้แคลเซียมคาร์บอเนตเกรดระดับอุตสาหกรรมและเกรดระดับห้องปฏิบัติการ เพื่อควบคุมความเป็นกรด-ด่าง โดยใช้เซลล์ตรึงของเชื้อ *C. oleophila* C-73 ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที

ชนิดของแคลเซียมคาร์บอเนต	ปริมาณ (กรัมต่อลิตร)	ความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง* (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณกรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ (กรัมต่อลิตร)
เกรดระดับอุตสาหกรรม	80	5.45	13.30	96.55	16.50
	100	5.25	13.48	98.79	10.62
	120	5.82	13.20	86.07	13.37
	140	5.97	13.12	75.47	14.68
เกรดระดับห้องปฏิบัติการ	100	4.16	16.15	138.76	2.62

* น้ำหนักเซลล์แห้ง เป็นน้ำหนักเซลล์แห้งของเซลล์อิสระที่เกิดขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



<u>รูปที่ 13</u> เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาว เมื่อแปรผันปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตเกรดระดับอุตสาหกรรม โดยการใช้เซลล์ตรึงของเชื้อ *C. oleophila* C-73 ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที

การศึกษาผลของสภาวะและอายุในการเก็บเซลล์ตรึงที่มีต่อการผลิตกรดมะนาว โดยการใช้เซลล์ตรึงของเชื้อ *C. oleophila* C-73

1. เมื่อทำเป็นเซลล์ตรึงอบแห้ง

Hamamci และ Hang (1989) พบว่า เซลล์ตรึงของเชื้อรา *A. niger* ที่อบแห้ง เป็นเทคโนโลยีใหม่ของการผลิตกรดมะนาวในระดับอุตสาหกรรมและเป็นการเก็บรักษาเซลล์ตรึง ดังนั้นจึงนำเซลล์ตรึงของ *C. oleophila* C-73 มาอบแห้ง (dried) ที่อุณหภูมิ 20, 30, 40 และ 50 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักคงที่ จากการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเซลล์ตรึงก่อนการอบแห้ง (undried) หลังการอบแห้ง (dried) และหลังการผลิตกรดมะนาว (dried reactivated) แสดงดังในตารางที่ 14 พบว่าอุณหภูมิที่ใช้ในการอบแห้งเซลล์ตรึง ไม่มีผลต่อขนาดของเซลล์ตรึงที่ได้โดยมีขนาดใกล้เคียงกัน แต่ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเซลล์ตรึงหลังการอบแห้งเล็กลงประมาณ 2 เท่า เมื่อเทียบกับก่อนการอบแห้ง และเมื่อใช้ผลิตกรดมะนาวแล้วเซลล์ตรึงมีขนาดใหญ่ขึ้นประมาณ 0.6 เท่า เมื่อเทียบกับหลังการอบแห้ง

เมื่ออบแห้งเซลล์ตรึงแล้วทำการเก็บเซลล์ตรึงอบแห้ง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1,30 และ 60 วัน นำเซลล์ตรึงมาผลิตกรดมะนาว เก็บตัวอย่างในวันที่ 8 ของการหมัก ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 15 และรูปที่ 14 พบว่า เมื่อใช้อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เซลล์ตรึงไม่สามารถผลิตกรดมะนาวได้ อาจเนื่องมาจากเซลล์ยีสต์ภายในเซลล์ตรึงไม่สามารถทนอุณหภูมิในการอบแห้งได้ แต่เมื่อใช้อุณหภูมิ 20,30 และ 40 องศาเซลเซียส เซลล์ตรึงนี้สามารถผลิตกรดมะนาวได้ในปริมาณที่ใกล้เคียงกันคือ 100.28, 101.76 และ 102.00 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยปริมาณกรดมะนาวลดลงประมาณ 26 เปอร์เซนต์ เมื่อเทียบกับการใช้เซลล์ตรึงก่อนการอบแห้ง และเมื่อเวลาในการเก็บนานขึ้น ปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้มีค่าลดลง โดยหลังจากเก็บเซลล์ตรึงที่อบแห้งแล้วนาน 60 วัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่ไม่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ นำเซลล์ตรึงนั้นมาผลิตกรดมะนาว พบว่ายังคงสามารถผลิตกรดมะนาวได้ โดยปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้ลดลงประมาณ 47 เปอร์เซนต์ เมื่อเทียบกับการใช้เซลล์ตรึงก่อนการอบแห้ง

ตารางที่ 14 แสดงการเปลี่ยนแปลงขนาดเซลล์ตรึงของเชื้อ *C. oleophila* C-73 ในสภาวะต่าง ๆ

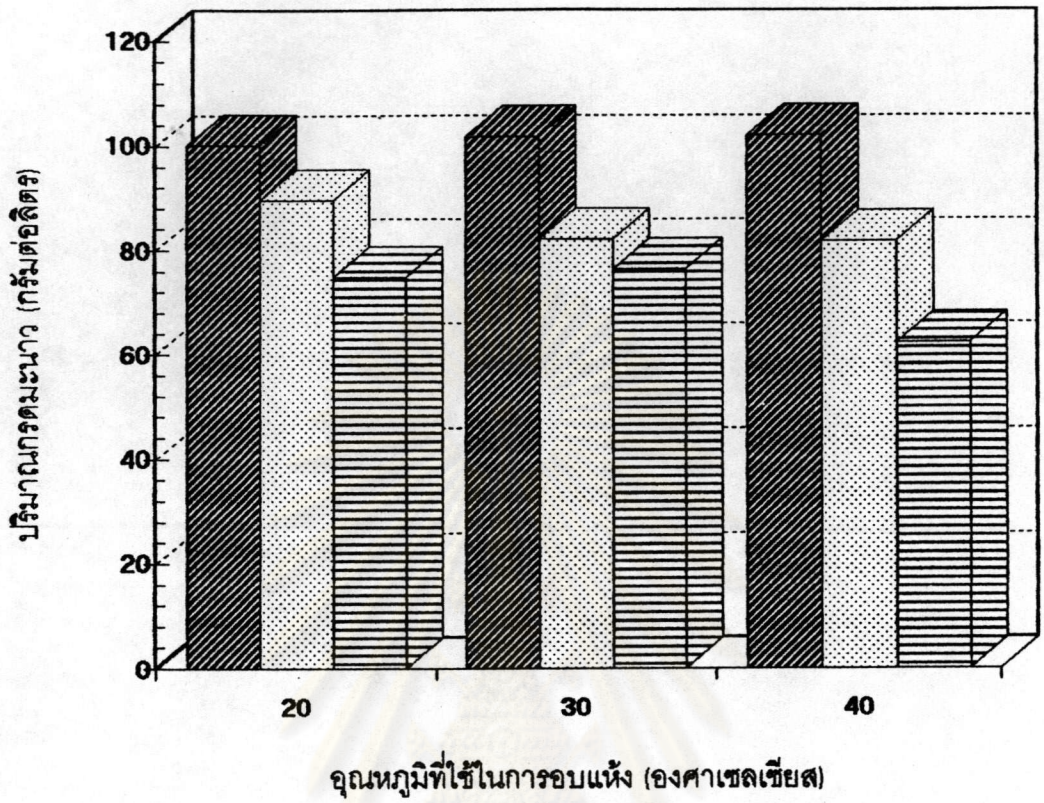
สภาวะของเซลล์ตรึง		เส้นผ่านศูนย์กลาง * (เซนติเมตร)
ก่อนการอบแห้ง (undried)		0.385
หลังการอบแห้ง (dried)		
ที่อุณหภูมิ	20 องศาเซลเซียส	0.178
	30 องศาเซลเซียส	0.178
	40 องศาเซลเซียส	0.175
	50 องศาเซลเซียส	0.175
หลังการผลิตกรดมะนาว (dried reactivated)		
ใช้เซลล์ตรึงอบแห้งที่อุณหภูมิ	20 องศาเซลเซียส	0.310
	30 องศาเซลเซียส	0.305
	40 องศาเซลเซียส	0.295
	50 องศาเซลเซียส	0.295

* ค่าเฉลี่ย จากการวัดความยาวของเซลล์ตรึงที่วางเรียงกันจำนวน 10 เม็ดเซลล์ตรึง โดยใช้ vernier calipper

ตารางที่ 15 การผลิตกรดมะนาว เมื่อแปรผันอุณหภูมิในการอบแห้งและระยะเวลาในการเก็บ โดยการใช้เซลล์ตรึงที่อบแห้งของเชื้อ *C. oleophila* C-73 ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที

อุณหภูมิในอบแห้ง (องศาเซลเซียส)	ระยะเวลาในการเก็บ (วัน)	ความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง* (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณกรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ (กรัมต่อลิตร)
20	1	5.24	16.50	100.28	20.73
	30	5.48	15.66	89.54	23.56
	60	5.50	15.43	78.69	39.61
30	1	5.20	16.30	101.76	27.34
	30	5.42	15.73	82.05	24.68
	60	5.48	14.75	76.36	29.46
40	1	5.21	14.77	102.00	24.11
	30	5.49	13.71	81.69	25.54
	60	5.54	12.68	62.15	33.72
50	1	6.47	2.30	0.59	198.43
ชุดควบคุม	-	4.05	15.46	136.42	2.06

* น้ำหนักเซลล์แห้ง เป็นน้ำหนักเซลล์แห้งของเซลล์อิสระที่เกิดขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ



รูปที่ 14 เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาว เมื่อแปรผันอุณหภูมิในการอบแห้งและระยะเวลาในการเก็บ โดยการใช้เซลล์ตรึงที่อบแห้งของเชื้อ *C. oleophila* C-73 ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที

โดยที่ ▨ ระยะเวลาในการเก็บ 1 วัน

▩ ระยะเวลาในการเก็บ 30 วัน

▤ ระยะเวลาในการเก็บ 60 วัน

2. <u>เมื่อเก็บเซลล์ตรึงในสภาวะต่าง ๆ</u>

นำเซลล์ตรึงของเชื้อ *C. oleophila* C-73 มาเก็บในสภาวะต่าง ๆ โดยเก็บในสภาวะชื้น (โดยเก็บในจานเพาะเชื้อ) สารละลายแคลเซียมคลอไรด์ (0.25 โมลาร์) สารละลายโซเดียมคลอไรด์ (0.85 เปอร์เซนต์) และน้ำกลั่น โดยเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15, 30, 45 และ 60 วัน นำเซลล์ตรึงมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดมะนาว เก็บตัวอย่างในวันที่ 8 ของการหมัก

ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 16 และรูปที่ 15 พบว่าเมื่อระยะเวลาในการเก็บนานขึ้น ปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้ส่วนใหญ่มีค่าลดลง และเมื่อเปรียบเทียบสภาวะในการเก็บต่างกัน ปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้มีค่าแตกต่างกันเล็กน้อย โดยเมื่อเก็บเซลล์ตรึงในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ สภาวะชื้น สารละลายแคลเซียมคลอไรด์และน้ำกลั่น เป็นเวลา 60 วัน แล้วนำเซลล์ตรึงมาผลิตกรดมะนาว ปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้เท่ากับ 123.76, 121.26, 111.23 และ 104.83 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ คิดเป็นปริมาณกรดมะนาวลดลงประมาณ 10,12,19 และ 24 เปอร์เซนต์ เมื่อเทียบกับเซลล์ตรึงที่ไม่ได้เก็บ

<u>การศึกษาความสามารถในการใช้เซลล์ตรึงของเชื้อ *C. oleophila* C-73 ซ้ำ เพื่อการผลิตกรดมะนาว</u>

เนื่องจากประโยชน์ของการตรึงเซลล์จุลินทรีย์เป็นการรักษาสมบัติของเซลล์ให้มีความสามารถในการเป็นแหล่งผลิตเอนไซม์ที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา และสามารถใช้เซลล์ตรึงซ้ำและใช้อย่างต่อเนื่องได้ ดังนั้นการทดลองนี้จึงศึกษาความสามารถในการผลิตกรดมะนาวเมื่อมีการใช้เซลล์ตรึงซ้ำ โดยเลี้ยงเซลล์ตรึงของเชื้อ *C. oleophila* C-73 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดมะนาว เก็บตัวอย่างในวันที่ 8 ของการหมัก ส่วนเซลล์ตรึงนั้นนำมาล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 30 มิลลิลิตร แล้วนำไปใช้ในการผลิตกรดมะนาวครั้งต่อไป ผลการทดลองแสดงดังในตารางที่ 17 และรูปที่ 16 แสดงให้เห็นว่าสามารถใช้เซลล์ตรึงนี้ซ้ำเพื่อการผลิตกรดมะนาวได้หลายครั้ง จากการทดลองนี้ใช้ได้อย่างน้อย 12 ครั้ง โดยปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้ในแต่ละครั้งมีค่าไม่แตกต่างกันมากนัก ในครั้งที่ 12 ปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้เท่ากับ 118.77 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 87.41 เปอร์เซนต์ เมื่อเทียบกับปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้ในครั้งแรก

ตารางที่ 16 การผลิตกรดมะนาว เมื่อแปรผันสภาวะและระยะเวลาในการเก็บ โดยการใช้เซลล์ตรึงของเชื้อ *C. oleophila* C-73 ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที

สภาวะในการเก็บ	ระยะเวลาในการเก็บ (วัน)	ความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง* (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณกรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ (กรัมต่อลิตร)
สภาวะชื้น	15	4.06	15.82	135.79	4.88
	30	4.04	15.62	138.39	2.80
	45	4.28	15.48	126.48	6.58
	60	4.31	15.32	121.26	10.02
สารละลายแคลเซียม-คลอไรด์	15	4.06	15.96	132.69	2.97
	30	4.29	15.71	123.76	9.80
	45	4.48	15.70	118.70	11.40
	60	4.59	15.21	111.23	13.75
สารละลายโซเดียม-คลอไรด์	15	4.05	15.38	136.12	2.40
	30	4.25	15.36	129.17	9.14
	45	4.27	15.13	127.31	3.49
	60	4.30	15.19	123.76	16.01

มีต่อ...

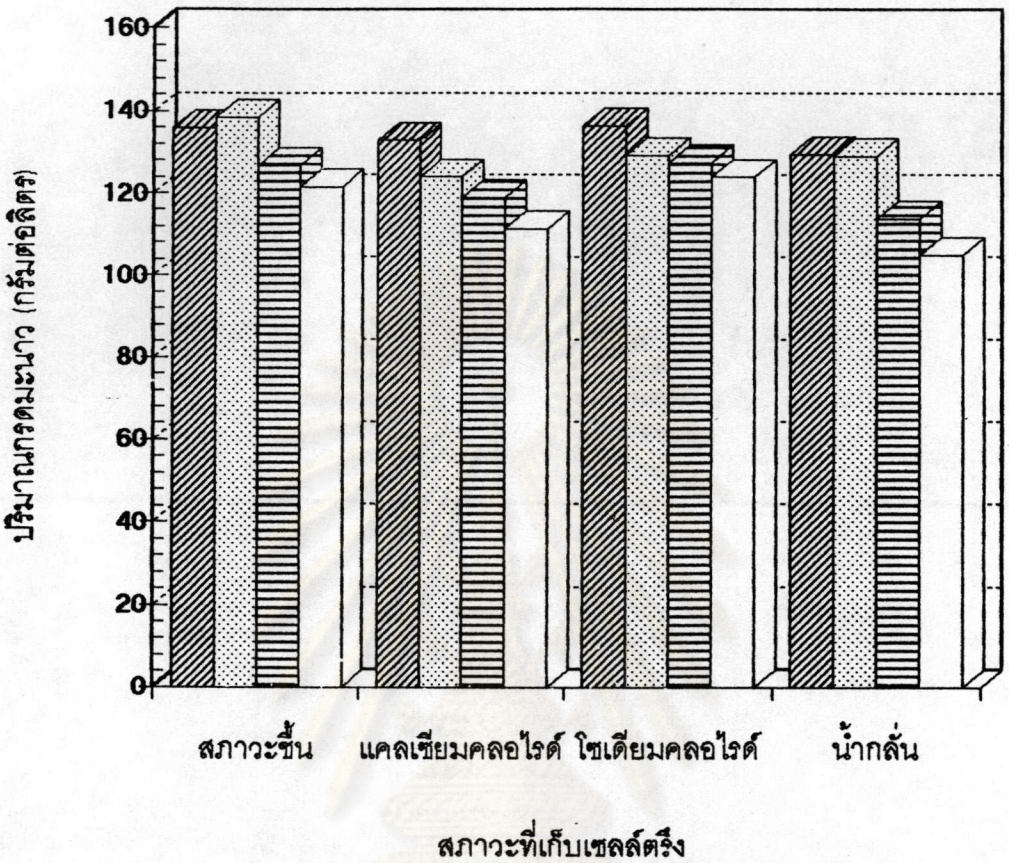
* น้ำหนักเซลล์แห้ง เป็นน้ำหนักเซลล์แห้งของเซลล์อิสระที่เกิดขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ

ตารางที่ 16 (ต่อ)

สภาวะในการเก็บ	ระยะเวลาในการเก็บ (วัน)	ความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง* (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณกรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ (กรัมต่อลิตร)
น้ำกลั่น	15	4.10	15.50	129.33	4.88
	30	4.12	15.30	128.75	6.19
	45	4.57	15.17	113.57	7.32
	60	4.65	15.14	104.83	12.27
ชุดควบคุม	-	4.02	15.52	137.54	4.12

* น้ำหนักเซลล์แห้ง เป็นน้ำหนักเซลล์แห้งของเซลล์อิสระที่เกิดขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



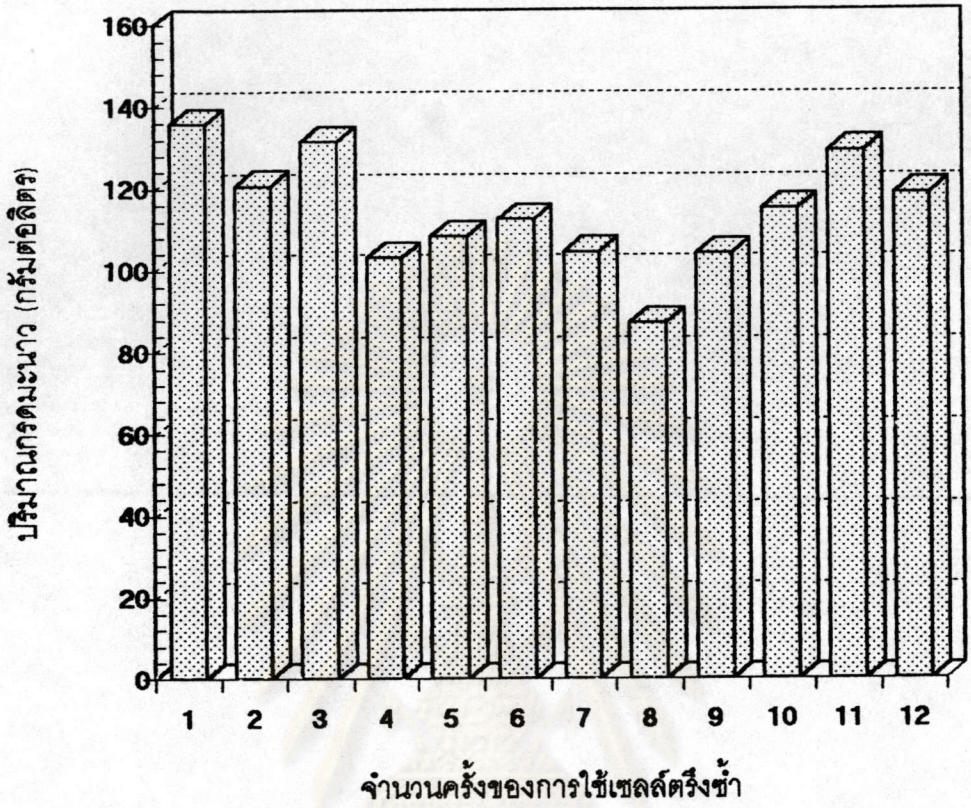
รูปที่ 15 เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาว เมื่อแปรผันสภาวะและระยะเวลาในการเก็บโดยการให้เซลล์ตรึงของเชื้อ *C. oleophila* C-73 ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที

โดยที่ ▨ ระยะเวลาในการเก็บ 15 วัน
⬚ ระยะเวลาในการเก็บ 30 วัน
▤ ระยะเวลาในการเก็บ 45 วัน
□ ระยะเวลาในการเก็บ 60 วัน

ตารางที่ 17 ผลของการใช้เซลล์ตรึงของเชื้อ *C. oleophila* C-73 ในการผลิตกรดมะนาว ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที

ครั้งที่	ความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง* (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณกรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ (กรัมต่อลิตร)
1	4.15	13.23	135.87	4.88
2	4.31	13.76	120.63	13.93
3	4.20	14.10	131.40	6.49
4	4.55	13.99	102.90	9.11
5	4.46	14.36	108.30	4.76
6	4.06	12.75	112.33	7.23
7	4.95	12.80	104.42	9.16
8	4.97	11.63	85.39	18.16
9	4.92	15.72	104.00	9.19
10	4.43	14.29	115.02	5.92
11	4.26	14.41	129.17	2.71
12	4.32	15.64	118.77	14.28

* น้ำหนักเซลล์แห้ง เป็นน้ำหนักเซลล์แห้งของเซลล์อิสระที่เกิดขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ



รูปที่ 16 ปริมาณกรดมะนาว จากการใช้เซลล์ตรึงของเชื้อ *C. oleophila* C-73 ซ้ำในการผลิตกรดมะนาว ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย