บทที่ 3

ผลการทดลอง

3.1 การคัดเลือก *Candida oleophila* สายพันธุ์กลาย จำนวน 5 สายพันธุ์ ที่ผลิตกรดมะนาวได้ดีจากสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลัง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

3.1.1 การคัดเลือก *Candida oleophila* สายพันธุ์กลายที่มีประสิทธิภาพการผลิตกรดมะนาวสูงสุด

สมเกียรติ พรพิสุทธิมาศ(2539)ได้ทำการกลายพันธุ์ยีสต์ *Candida oleophila* NNU-48 และคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพการผลิตกรดมะนาวสูงที่อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียสในอาหารที่ใช้สารละลายน้ำตาลจากแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยแล้วและคัดเลือกได้สายพันธุ์ที่ผลิตกรดมะนาวได้สูง คือ สายพันธุ์ NNU-48 U33-13 UN33-24 และUNN33-3 โดยได้สายพันธุ์ UNN33-3 เป็นสายพันธุ์ที่ผลิตกรดมะนาวได้สูงสุด และสินีนาถ เจียมอนุกูลกิจ (2539) ทำการผลิตกรดมะนาวโดย *Candida oleophila* NN-39 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จากสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลัง ในงานวิจัยนี้จะทำการศึกษาการผลิตกรดมะนาวจากสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังโดย *Candida oleophila* สายพันธุ์กลาย ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยคัดเลือกยีสต์จากสายพันธุ์กลายที่สมเกียรติได้คัดเลือกไว้ (สมเกียรติ, 2539) และสายพันธุ์ที่สินีนาถ (2539) ได้ทำการศึกษารวมจำนวน 5 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ NNU-48 U33-13 UN33-24 UNN33-3 และ NN-39 แล้วนำมาเลี้ยงในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ (ภาคผนวก ก 1.1) ตามวิธีการเตรียมหัวเชื้อในข้อ 2.3.2.1 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นนำมาเลี้ยงในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาว ซึ่งใช้สารละลายน้ำตาลจากการย่อยกากมันสำปะหลัง (ภาคผนวก ก 2.2) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ตามวิธีการทดลองในข้อ 2.3.2.2 เก็บตัวอย่างน้ำหมักที่เวลา 96 และ120 ชั่วโมง ทำการวิเคราะห์หาน้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิทริก และน้ำตาลกลูโคสที่เหลือ ตามวิธีวิเคราะห์ในข้อ 2.4 ได้ผลดังแสดงในตารางและรูปที่ 3-1 , 3-2 พบว่า ยีสต์สายพันธุ์ UNN33-3 มีประสิทธิภาพการผลิตกรดมะนาวสูงที่สุด คือที่เวลา 96 ชั่วโมงให้ปริมาณกรดมะนาวเท่ากับ 99.46 กรัมต่อลิตร กรดไอโซซิทริกเท่ากับ 12.50 กรัมต่อลิตร อัตราส่วนกรดมะนาวต่อกรดไอโซซิทริก

เท่ากับ 7.95 ที่เวลา 120 ชั่วโมงให้ปริมาณกรดมะนาวเท่ากับ 122.47 กรัมต่อลิตร กรดไอโซซิทริก เท่ากับ 14.14 กรัมต่อลิตร อัตราส่วนกรดมะนาวต่อกรดไอโซซิทริกเท่ากับ 8.66 และน้ำหมักไม่มีความหนืด ดังนั้นจึงคัดเลือก *Candida oleophila* สายพันธุ์กลาย UNN33-3 ไว้ทำการศึกษาต่อไป

3.1.2 ลักษณะการเจริญของ *Candida oleophila* UNN33-3 ในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ

ทำการเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* UNN33-3 ในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ (ภาคผนวก ก 1.1) ตามวิธีการทดลองในข้อ 2.3.2.1 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ติดตามการเจริญของเชื้อทุก 3 ชั่วโมง จนครบ 24 ชั่วโมง แล้วทำการวิเคราะห์หาน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามวิธีวิเคราะห์ในข้อ 2.4 ผลการทดลองที่ได้แสดงดังตารางที่ 3-3 และ รูปที่3-3 พบว่าเชื้อจะเริ่มเข้าสู่ระยะการเจริญแบบทวีคูณ (log phase) ในชั่วโมงที่ 6 และเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างรวดเร็วจนถึงชั่วโมงที่ 15 จะอยู่ในช่วงท้ายของการเจริญแบบทวีคูณและเข้าสู่ระยะการเจริญแบบคงที่ (stationary phase) ในชั่วโมงที่ 15 นี้จะมีน้ำหนักเซลล์แห้งประมาณ 7 กรัมต่อลิตร รูปแบบการเจริญของ *Candida oleophila* UNN33-3 ในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อมีลักษณะใกล้เคียงกับงานวิจัยของ เชาวรีย์ เรืองวิไลทรัพย์ (2539) ซึ่งได้รายงานไว้ว่าอายุหัวเชื้อของ Candida oleophila NN-39 ที่ 15 ชั่วโมง เป็นอายุของหัวเชื้อที่เหมาะสมในการนำไปผลิตกรดมะนาว ดังนั้นในการทดลองต่อไปจะใช้หัวเชื้ออายุ 15 ชั่วโมงและมีปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวเท่ากับ 0.7 กรัมต่อลิตร ในการผลิตกรดมะนาวต่อไป

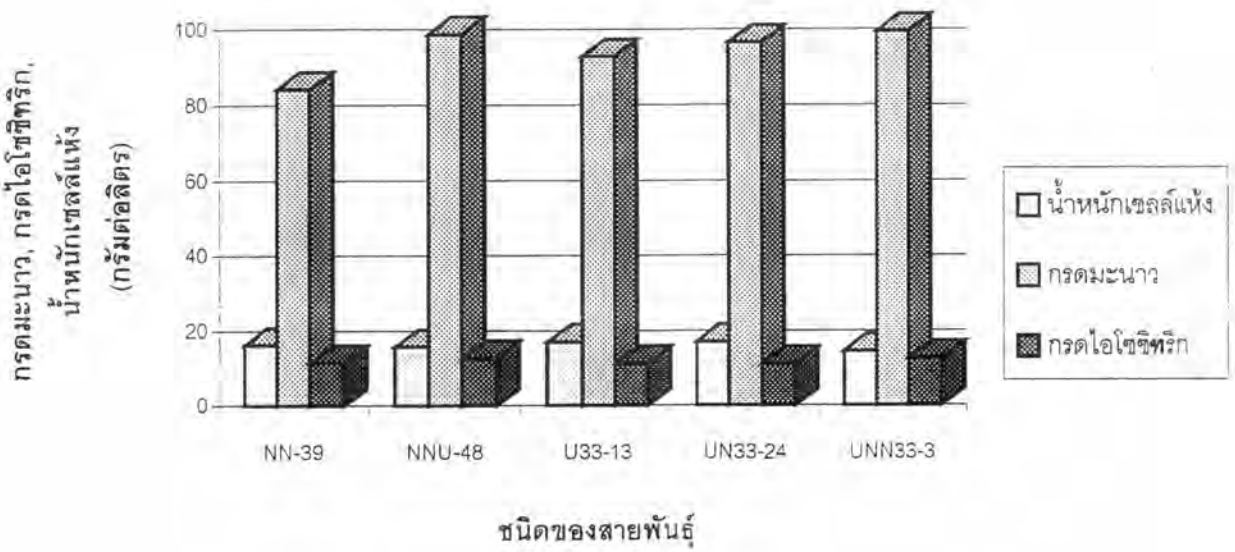
ตารางที่ 3-1 เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิทริก น้ำหนักเซลล์แห้ง ระดับความหนืด ค่าความเป็นกรด-ด่าง และปริมาณกลูโคสที่เหลือ เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* สายพันธุ์กลาย 5 สายพันธุ์ ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาวที่มีกากมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยกรดเป็นแหล่งคาร์บอน เป็นเวลา 96 ชั่วโมง

สายพันธุ์	ระดับความหนืด	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กลูโคสที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	กรดไอโซซิทริก (กรัมต่อลิตร)	อัตราส่วนกรดมะนาวต่อกรดไอโซซิทริก	ผลผลิตกรดมะนาว (ร้อยละ)
NN-39	0	6.03	16.20	19.55	84.16	11.46	7.34	41.99
NNU-48	0	5.90	15.68	19.99	98.65	12.58	7.84	49.32
U33-13	0	5.93	17.00	15.30	92.78	11.26	8.24	45.32
UN33-24	0	5.95	16.96	17.45	96.48	11.06	8.72	47.63
UNN33-3	0	5.75	14.56	19.67	99.46	12.50	7.95	49.65

หมายเหตุ - ผลผลิตกรดมะนาว (ร้อยละ) = [(P1-P0) / (S0-S1)] X 100

คือ (กรดมะนาวที่ได้(กรัมต่อลิตร) / น้ำตาลกลูโคสที่ใช้ไป(กรัมต่อลิตร)) X 100

- ระดับความหนืดเรียงลำดับจากมากไปน้อยดังนี้ 5+ > 4+ > 3+ > 2+ > 1+ > 0 โดยน้ำหมักที่มีความหนืดเท่ากับ 5+ นั้นสามารถคว่ำขวดทดลองรูปชมพู่ได้โดยน้ำหมักไม่ไหล



ภาพที่ 3-1 เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิทริก และน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* สายพันธุ์กลาย อี สายพันธุ์ ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวที่ระยะเวลาในการหมัก 96 ชั่วโมง

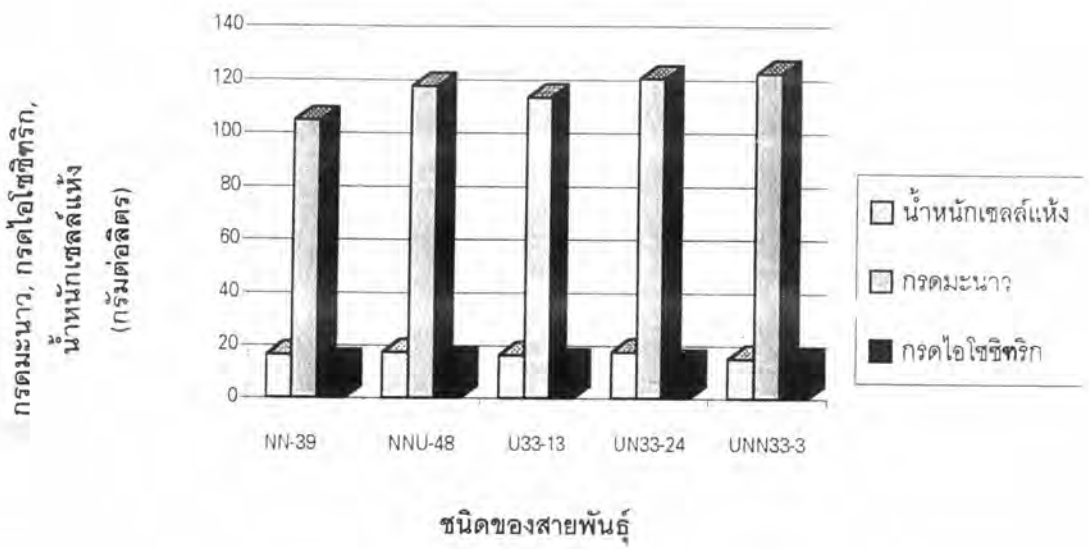
ตารางที่ 3-2 เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิทริก น้ำหนักเซลล์แห้ง ระดับความหนืด ค่าความเป็นกรด-ด่าง และปริมาณกลูโคสที่เหลือ เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* สายพันธุ์กลาย 5 สายพันธุ์ ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาวที่มีกากมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยกรดเป็นแหล่งคาร์บอน เป็นเวลา 120 ชั่วโมง

สายพันธุ์	ระดับความหนืด	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กลูโคสที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	กรดไอโซซิทริก (กรัมต่อลิตร)	อัตราส่วนกรดมะนาวต่อกรดไอโซซิทริก	ผลผลิตกรดมะนาว (ร้อยละ)
NN-39	0	5.76	16.38	7.36	104.61	13.38	7.82	49.20
NNU-48	0	5.37	17.32	8.18	117.45	14.47	8.12	55.45
U33-13	0	5.53	16.32	7.87	113.32	13.74	8.25	53.42
UN33-24	0	5.65	17.48	8.12	120.34	13.40	8.98	56.80
UNN33-3	0	4.80	15.20	7.11	122.47	14.14	8.66	57.53

หมายเหตุ - ผลผลิตกรดมะนาว (ร้อยละ) = [(P1-P0) / (S0-S1)] X 100

คือ (กรดมะนาวที่ได้(กรัมต่อลิตร) / น้ำตาลกลูโคสที่ใช้ไป(กรัมต่อลิตร)) X 100

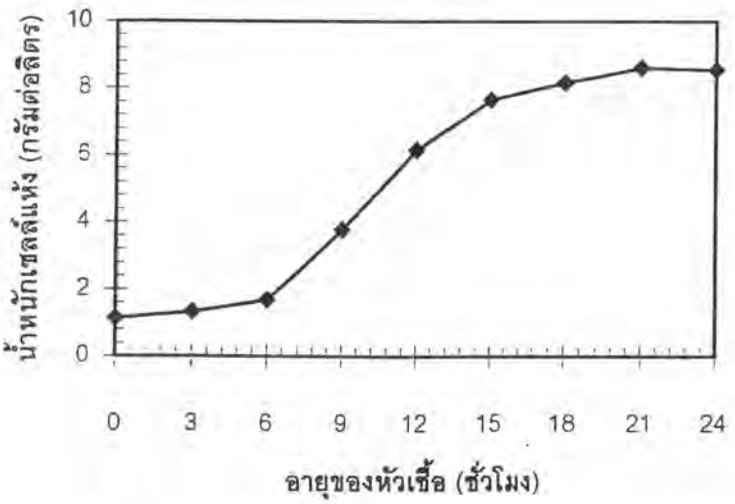
- ระดับความหนืดเรียงลำดับจากมากไปน้อยดังนี้ 5+ > 4+ > 3+ > 2+ > 1+ > 0 โดยน้ำหมักที่มีความหนืดเท่ากับ 5+ นั้นสามารถคว่ำขวดทดลองรูปชมพู่ได้โดยน้ำหมักไม่ไหล



รูปที่ 3-2 เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิทริก และน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* สายพันธุ์กลาย 5 สายพันธุ์ ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาว ที่ระยะเวลาในการหมัก 120 ชั่วโมง

ตารางที่ 3-3 น้ำหนักเซลล์แห้งของ *Candida oleophila* UNN33-3 เมื่อเลี้ยงในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อในระยะเวลาต่าง ๆ

อายุเชื้อ (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	อัตราการเจริญจำเพาะ (กรัมต่อชั่วโมง)
0	1.13	0.00
3	1.33	0.07
6	1.67	0.11
9	3.76	0.70
12	6.15	0.80
15	7.65	0.50
18	8.16	0.17
21	8.62	0.15
24	8.56	0.02



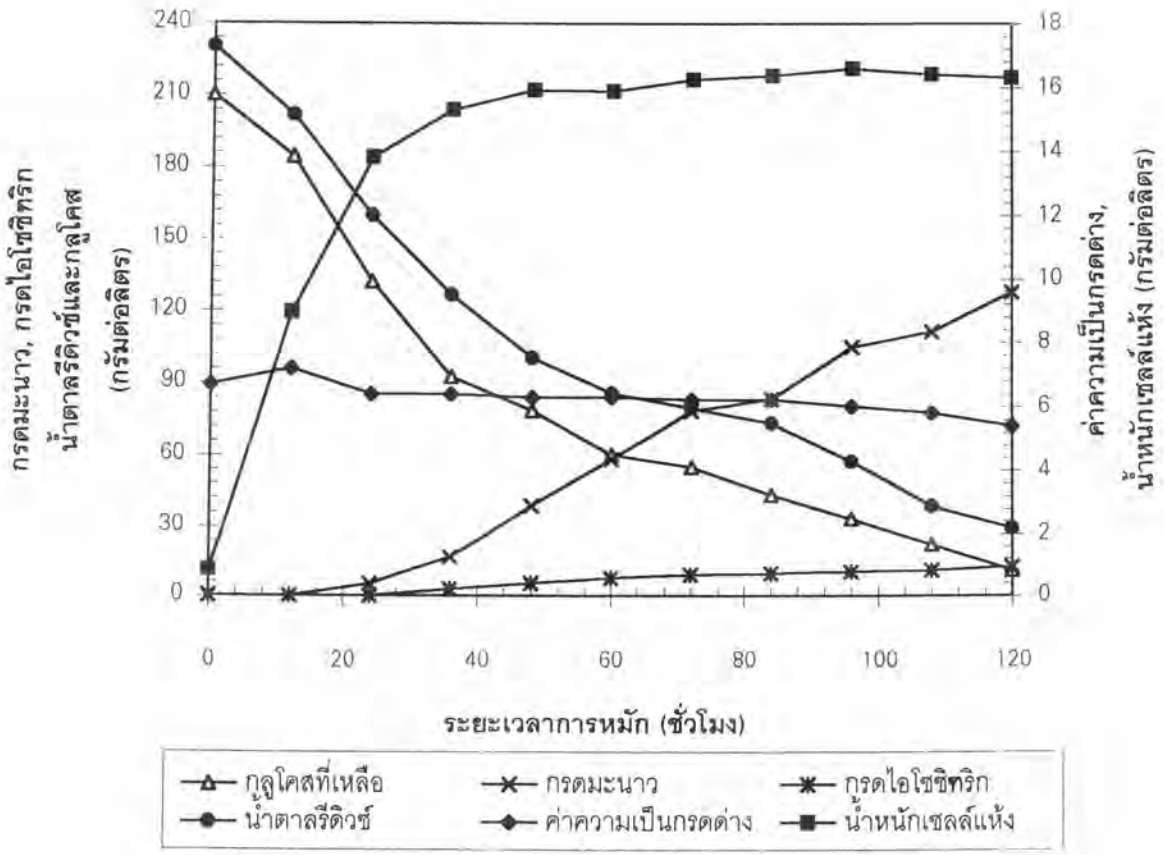
รูปที่ 3-3 รูปแบบการเจริญของเชื้อ *Candida oleophila* UNN33-3 ในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ

3.1.3 ลักษณะการเจริญ การผลิตกรดมะนาว กรดไอโซซิทริกและการใช้น้ำตาลของ *Candida oleophila* UNN 33-3 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวที่ใช้สารละลายน้ำตาลจากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดซัลฟิวริกเป็นแหล่งคาร์บอน

ทำการเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* UNN33-3 ในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ (ภาคผนวก ก 1.1) ตามวิธีการทดลองในข้อ 2.3.2.1 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จนหัวเชื้อมีอายุ 15 ชั่วโมง นำมาเลี้ยงในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาว (ภาคผนวก ก 2.2) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ตามวิธีการทดลองในข้อ 2.3.2.2 ทำการเก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมงเป็นเวลา 120 ชั่วโมง แล้วทำการวิเคราะห์หาน้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิทริก และปริมาณน้ำตาลที่เหลือตามวิธีวิเคราะห์ในข้อ 2.4 ผลการทดลองที่ได้แสดงดังตารางและรูปที่ 3-4 พบว่าในช่วง 24 ชั่วโมงแรก เชื้อมีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วหลังจากนั้นการเจริญจะเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆจนถึงชั่วโมงที่ 72 ของการหมักการเจริญจึงเข้าสู่ระยะคงที่และในชั่วโมงที่ 120 มีน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 16.31 กรัมต่อลิตร ในด้านการผลิตกรดมะนาวของเชื้อพบว่า จะเริ่มผลิตกรดมะนาวใน ชั่วโมงที่ 24 ของการหมักและมีปริมาณเพิ่มขึ้นเรื่อยๆจนถึงชั่วโมงที่ 120 จะมีปริมาณกรดมะนาวสูงสุดเท่ากับ 127.67 กรัมต่อลิตร กรดไอโซซิทริกเท่ากับ 12.07 กรัมต่อลิตร ซึ่งการผลิตกรดมะนาวที่เพิ่มขึ้นนี้สอดคล้องกับปริมาณการใช้น้ำตาลกลูโคสของเชื้อ โดยปริมาณกลูโคสที่เหลือในชั่วโมงที่ 120 เท่ากับ 10.50 กรัมต่อลิตร ระดับความเป็นกรด-ด่างมีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยเนื่องจากมีแคลเซียมคาร์บอเนตควบคุมความเป็นกรด-ด่าง

ตารางที่ 3-4 ปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิทริก น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรด-ด่าง และปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือเมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* UNN33-3 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวซึ่งมีสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนที่ระยะเวลาต่าง ๆ

อายุเชื้อ (ชั่วโมง)	ระดับความหนืด	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กลูโคสที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	กรดไอโซซิทริก (กรัมต่อลิตร)	อัตราส่วนกรดมะนาวต่อกรดไอโซซิทริก	ผลผลิตกรดมะนาว (ร้อยละ)
0	0	6.7	0.80	210.00	-	-	-	0.00
12	0	7.2	8.96	184.40	-	-	-	0.00
24	0	6.4	13.80	132.12	4.85	-	-	6.23
36	0	6.4	15.28	92.50	16.38	2.62	6.25	13.94
48	0	6.3	15.92	78.50	38.69	5.23	7.39	29.42
60	0	6.3	15.88	60.00	57.92	7.20	8.04	38.61
72	0	6.2	16.24	54.36	78.20	8.50	9.20	50.24
84	0	6.2	16.36	42.93	83.11	9.16	9.07	49.75
96	0	6.0	16.58	32.98	104.60	9.85	10.56	59.09
108	0	5.8	16.40	21.90	111.00	10.61	10.46	59.01
120	0	5.4	16.31	10.50	127.67	12.07	10.58	63.99



รูปที่ 3-4 ลักษณะการเจริญ การผลิตกรดมะนาว กรดไอโซซิทริก น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรด-ด่าง และการใช้น้ำตาลกลูโคสของ *Candida oleophila* UNN33-3 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวซึ่งมีสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน ที่ระยะเวลาต่างๆ

3.2 ผลของสารตกค้างในกากมันสำปะหลังที่มีต่อการผลิตกรดมะนาวในระดับขวดเขย่า

สินีนาถ (2539) ได้ทำการศึกษาอิทธิพลของสารเจือปนในสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังต่อการผลิตกรดมะนาวพบว่าสารตกค้างในกากมันสำปะหลังสามารถกำจัดออกได้บางส่วนโดยการล้างน้ำ ดังนั้นในการทดลองนี้จะศึกษาการผลิตกรดมะนาวโดย *Candida oleophila* UNN33-3 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสในระดับขวดเขย่า โดยใช้สารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังที่ผ่านการล้างน้ำและไม่ผ่านการล้างน้ำทั้งกากมันสำปะหลังชนิดตากแห้งและกากมันสำปะหลังสด

3.2.1ปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้จากสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังสดที่ผ่านการล้างน้ำและไม่ล้างน้ำ

นำสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังสดที่ผ่านการล้างน้ำและไม่ผ่านการล้างน้ำ ตามภาคผนวก ข 2 มาเตรียมอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาว(ภาคผนวก ก 2.3) นำไปเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* UNN33-3 ที่มีอายุ 15 ชั่วโมงตามการทดลองที่ 3.1.2 เพื่อผลิตกรดมะนาวที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสในระดับขวดเขย่า ได้ผลดังตารางที่ 3-5 พบว่าการใช้สารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังสดที่ผ่านการล้างน้ำเป็นแหล่งคาร์บอนให้ผลผลิตกรดมะนาวเท่ากับ 93.97 กรัมต่อลิตรเมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 96 ชั่วโมง โดยมีอัตราส่วนกรดมะนาวต่อกรดไอโซซิทริกและน้ำหนักเซลล์แห้งที่สูงกว่าการใช้สารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังสดที่ไม่ผ่านการล้างน้ำ

3.2.2 ปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้จากสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังแห้งที่ผ่านการล้างน้ำและไม่ล้างน้ำ

นำสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังแห้งที่ผ่านการล้างน้ำและไม่ผ่านการล้างน้ำ ตามภาคผนวก ข 3 มาเตรียมอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาว (ภาคผนวก ก 2.4) นำไปเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* UNN33-3 ที่มีอายุ 15 ชั่วโมงตามการทดลองที่ 3.1.2 เพื่อผลิตกรดมะนาวที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสในระดับขวดเขย่า ได้ผลดังตารางที่ 3-6 พบว่าการใช้สารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังแห้งที่ผ่านการล้างน้ำเป็นแหล่งคาร์บอนให้ผลผลิตกรดมะนาวเท่ากับ 87.07 กรัมต่อลิตรเมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 96 ชั่วโมง ซึ่งสูงกว่าการใช้สารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังแห้งที่ไม่ผ่านการล้างน้ำ

ตารางที่ 3-5 เปรียบเทียบการผลิตกรดมะนาว กรดไอโซซิทริก และน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* UNN33-3 โดยใช้สารละลายน้ำตาลจากกากมันสำปะหลังสดที่ผ่านการล้างน้ำและไม่ผ่านการล้างน้ำ ที่ระยะเวลาในการหมัก 96 ชั่วโมง

แหล่งคาร์บอน	ระดับความหนืด	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กลูโคสที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	กรดไอโซซิทริก (กรัมต่อลิตร)	อัตราส่วนกรดมะนาวต่อกรดไอโซซิทริก	ผลผลิตกรดมะนาว (ร้อยละ)
กากมันสำปะหลังสดที่ผ่านการล้างน้ำ	0	6.41	18.86	12.60	93.97	12.43	7.56	45.31
กากมันสำปะหลังสดที่ไม่ผ่านการล้างน้ำ	0	6.31	17.64	20.91	83.50	11.18	7.47	41.94

หมายเหตุ ระดับความหนืดเรียงลำดับจากมากไปน้อยดังนี้ 5+ > 4+ > 3+ > 2+ > 1+ > 0 โดยน้ำหมักที่มีความหนืดเท่ากับ 5+ นั้นสามารถคว่ำขวดทดลองรูปชมพู่ได้โดยน้ำหมักไม่ไหล

ตารางที่ 3-6 เปรียบเทียบการผลิตกรดมะนาว กรดไอโซซิทริก และน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* UNN33-3 โดยใช้สารละลายน้ำตาลจากกากมันสำปะหลังแห้งที่ผ่านการล้างน้ำและไม่ผ่านการล้างน้ำ ที่ระยะเวลาในการหมัก 96 ชั่วโมง

แหล่งคาร์บอน	ระดับความหนืด	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กลูโคสที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	กรดไอโซซิทริก (กรัมต่อลิตร)	อัตราส่วนกรดมะนาวต่อกรดไอโซซิทริก	ผลผลิตกรดมะนาว (ร้อยละ)
กากมันสำปะหลังแห้งที่ผ่านการล้างน้ำ	0	6.02	16.71	21.30	87.07	10.97	7.94	43.82
กากมันสำปะหลังแห้งที่ไม่ผ่านการล้างน้ำ	0	6.15	15.09	38.70	77.15	10.24	7.53	42.55

หมายเหตุ ระดับความหนืดเรียงลำดับจากมากไปน้อยดังนี้ 5+ > 4+ > 3+ > 2+ > 1+ > 0 โดยน้ำหมักที่มีความหนืดเท่ากับ 5+ นั้นสามารถคว่ำขวดทดลองรูปชมพูได้โดยน้ำหมักไม่ไหล

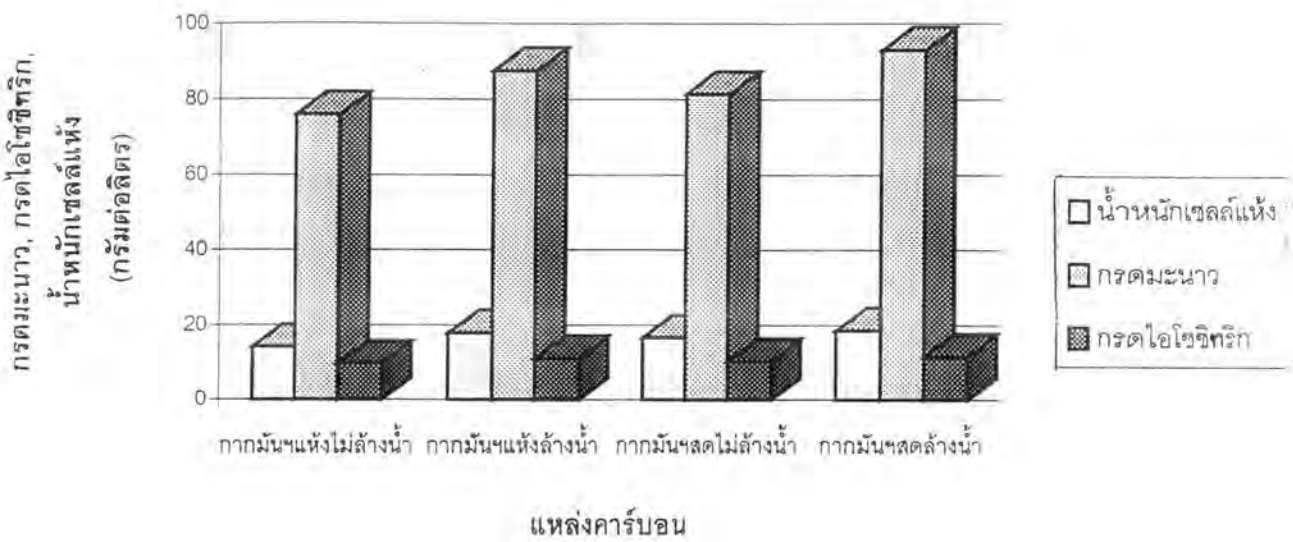
3.2.3 เปรียบเทียบการผลิตกรดมะนาวของ *Candida oleophila* UNN 33-3 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวโดยใช้สารละลายน้ำตาลจากกากมันสำปะหลังแบบต่างๆ

จากการทดลองที่ 3.2.1และ 3.2.2 พบว่าการใช้สารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังที่ผ่านการล้างน้ำทั้งชนิดกากมันสำปะหลังสดและแห้งจะให้ผลผลิตกรดมะนาวที่สูงกว่ากากมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการล้างน้ำ ในการทดลองนี้ได้ทำการเปรียบเทียบอีกครั้ง โดยทำการทดลองเปรียบเทียบทั้งหมดในรุ่นเดียวกันโดยเลี้ยงเป็นเวลา 96 ชั่วโมง ได้ผลดังตารางที่ 3-7และรูปที่ 3-5 พบว่าการผลิตกรดมะนาวโดยใช้สารละลายน้ำตาลจากการย่อยกากมันสำปะหลังสดที่ผ่านการล้างน้ำจะให้ปริมาณกรดมะนาวสูงที่สุดเท่ากับ 92.99 กรัมต่อลิตร รวมทั้งมีน้ำหนักเซลล์แห้งและอัตราส่วนกรดมะนาวต่อกรดไอโซซิทริกสูงที่สุดด้วย ดังนั้นการใช้สารละลายน้ำตาลจากการย่อยกากมันสำปะหลังสดที่ผ่านการล้างน้ำจะให้ผลผลิตสูงกว่าการใช้สารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังแห้ง ในการทดลองต่อไปจะทำการศึกษาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดมะนาวจะได้ใช้สารละลายน้ำตาลจากการย่อยกากมันสำปะหลังสดที่ผ่านการล้างน้ำเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตกรดมะนาวต่อไป

ตารางที่ 3-7 เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิทริก น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรด-ด่าง และน้ำตาลกลูโคสที่เหลือ เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* UNN33-3 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวที่ใช้สารละลายน้ำตาลจากกากมันสำปะหลังแบบต่าง ๆ ที่ระยะเวลาในการหมัก 96 ชั่วโมง

แหล่งคาร์บอน	ระดับความหนืด	ค่าความเป็นกรดด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กลูโคสที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	กรดไอโซซิทริก (กรัมต่อลิตร)	อัตราส่วนกรดมะนาวต่อกรดไอโซซิทริก	ผลผลิตกรดมะนาว (ร้อยละ)
กากมันสำปะหลังแห้งที่ไม่ผ่านการล้างน้ำ	0	6.03	14.12	46.54	75.86	9.72	7.80	43.73
กากมันสำปะหลังแห้งที่ผ่านการล้างน้ำ	0	5.91	17.84	20.33	87.52	11.03	7.93	43.83
กากมันสำปะหลังสดที่ไม่ผ่านการล้างน้ำ	0	6.27	16.56	27.01	81.31	10.29	7.90	42.13
กากมันสำปะหลังสดที่ผ่านการล้างน้ำ	0	6.30	18.60	12.61	92.99	11.51	8.08	44.84

หมายเหตุ ระดับความหนืดเรียงลำดับจากมากไปน้อยดังนี้ 5+ > 4+ > 3+ > 2+ > 1+ > 0 โดยน้ำหมักที่มีความหนืดเท่ากับ 5+ นั้นสามารถคว่ำขวดทดลองรูปชมพู่ได้โดยน้ำหมักไม่ไหล



รูปที่ 3-5 เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิทริก และน้ำหนักเซลล์แห้งเมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* UNN33-3 เป็นเวลา 96 ชั่วโมง ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวที่ใช้สารละลายน้ำตาลจากกากมันสำปะหลังแบบต่างๆ

3.3 ภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดมะนาวโดย *Candida oleophila* UNN33-3 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวที่ใช้สารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังสดที่ผ่านการล้างน้ำ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในระดับขวดเขย่า

จากการศึกษาการผลิตกรดมะนาวโดย *Candida oleophila* สายพันธุ์กลาย เชาวรีย์ (2539) ได้ทำการผลิตโดยใช้สารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง ต่อมา สินีนาถ (2539) ได้ดัดแปลงมาใช้สารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังแต่ปริมาณสารอาหารต่างๆ ยังคงใช้ในปริมาณเดิม ในการศึกษานี้จึงได้แปรผันปริมาณสารต่างๆในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาว เพื่อให้เหมาะสมต่อการผลิตกรดมะนาวโดยใช้สารละลายน้ำตาลจากการย่อยกากมันสำปะหลัง โดย *Candida oleophila* UNN 33-3 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

3.3.1 ปริมาณน้ำตาลกลูโคสในสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังสดที่ผ่านการล้างน้ำ ที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดมะนาว

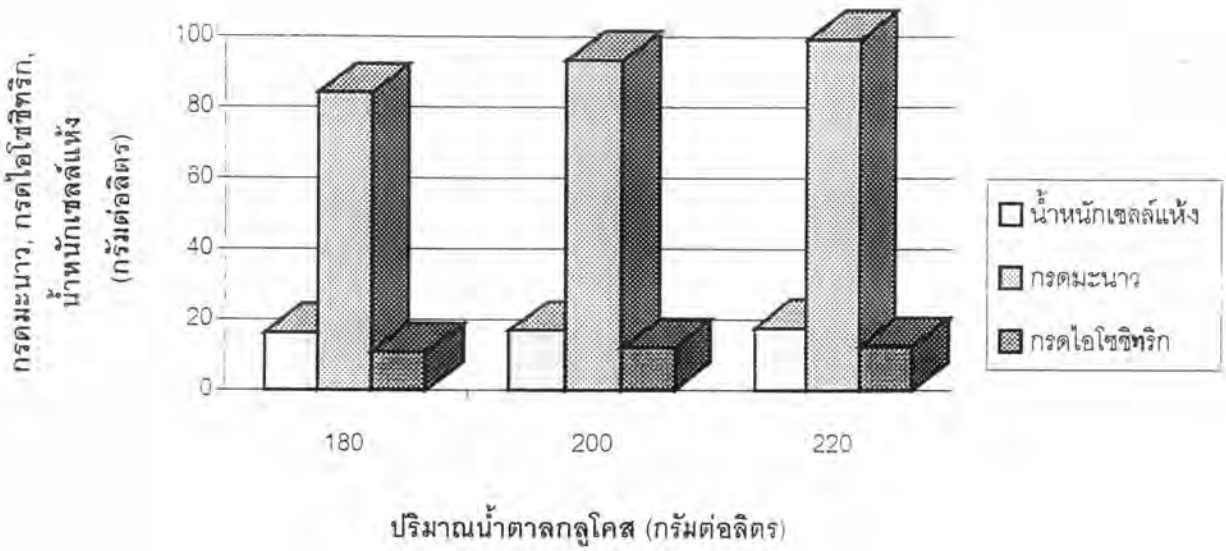
จากการศึกษาลักษณะการเจริญและการผลิตกรดมะนาวของ *Candida oleophila* UNN33-3 ในการทดลองที่ 3.1.3 ซึ่งใช้ปริมาณกลูโคสเริ่มต้น 220 กรัมต่อลิตร พบว่าที่เวลาการหมัก 96 และ120 ชั่วโมง มีกลูโคสเหลืออยู่ 32.98 และ10.50 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ จึงทำการทดลองหาปริมาณน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นที่มีปริมาณน้อยที่สุดแต่ยังคงเพียงพอต่อการเจริญของ *Candida oleophila* UNN33-3 และให้ปริมาณกรดมะนาวสูงสุด ทำการแปรผันปริมาณกลูโคสเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช้สารละลายน้ำตาลจากการย่อยกากมันสำปะหลังสดเท่ากับ 180 200 และ 220 กรัมต่อลิตร ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 3-8 และรูปที่ 3-6 พบว่าปริมาณน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นที่ 220 กรัมต่อลิตร ให้ผลผลิตกรดมะนาวสูงสุดเท่ากับ 99.19 กรัมต่อลิตร คิดเป็นผลผลิตกรดมะนาวร้อยละ 45.54 โดยมีกลูโคสเหลืออยู่ 2.17 กรัมต่อลิตรที่เวลาการหมัก 96 ชั่วโมง ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ปริมาณกลูโคส 180 และ 200 กรัมต่อลิตร จะให้ผลผลิตกรดมะนาวต่ำลงมาคือ 84.16 และ 93.36 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ดังนั้นปริมาณกลูโคสเริ่มต้นที่ 220 กรัมต่อลิตร จึงเป็นปริมาณกลูโคสที่เหมาะสมในการเตรียมอาหารเพื่อผลิตกรดมะนาวต่อไป

ตารางที่ 3-8 เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิทริก น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรด-ด่าง และน้ำตาลกลูโคสที่เหลือ เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* UNN33-3 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวที่มีการแปรผันปริมาณน้ำตาลกลูโคส ที่ระยะเวลาในการหมัก 96 ชั่วโมง

ปริมาณน้ำตาลกลูโคส (กรัมต่อลิตร)	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	กลูโคสที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	กรดไอโซซิทริก (กรัมต่อลิตร)	อัตราส่วนกรดมะนาวต่อกรดไอโซซิทริก	ผลผลิตกรดมะนาว (ร้อยละ)
180	6.5	16.32	20.14	--	84.16	10.82	7.78	46.76
200	6.3	16.96	24.71	--	93.36	12.11	7.71	46.68
220	6.3	17.68	27.63	2.17	99.19	12.50	7.93	45.54

หมายเหตุ 1. --- หมายถึง มีปริมาณน้อยมากจนไม่สามารถวิเคราะห์ได้ด้วยการวิเคราะห์กลูโคสโดยใช้พีจีโอเอนไซม์

2. ระดับความหนืดเป็น 0 ทุกตัวอย่าง



รูปที่ 3-6 เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิทริก และน้ำหนักเซลล์แห้งเมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* UNN33-3 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวที่มีการแปรผันปริมาณน้ำตาลกลูโคส ที่ระยะเวลาในการหมัก 96 ชั่วโมง

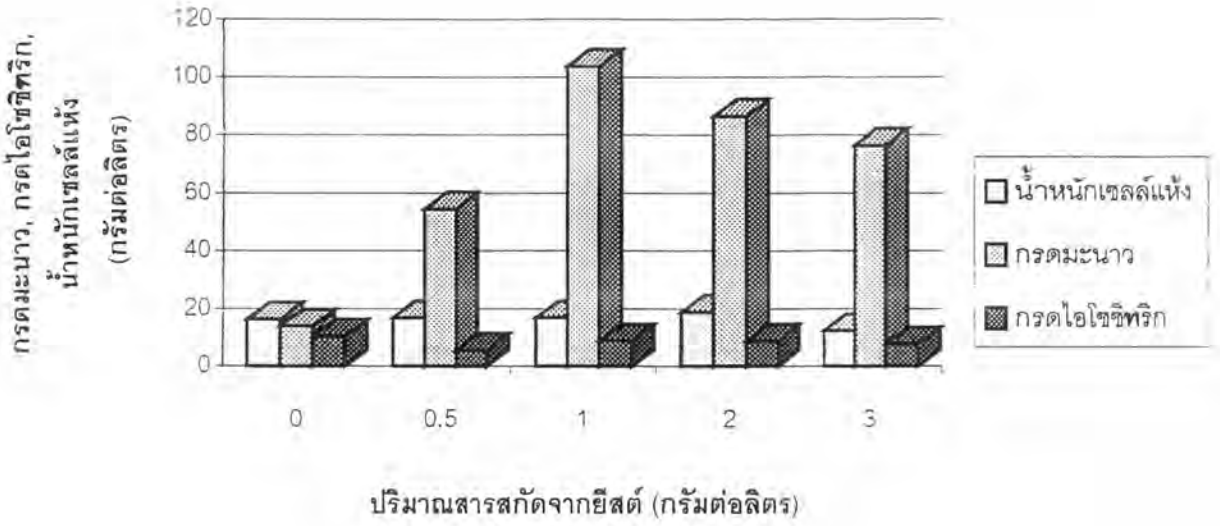
3.3.2 ปริมาณสารสกัดจากยีสต์ที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดมะนาว

สารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน วิตามิน และแร่ธาตุหลายชนิด (Sikyta ,1983) ซึ่งช่วยส่งเสริมการเจริญและการผลิตกรดมะนาวของยีสต์ ในการผลิตกรดมะนาวจากแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ จะใช้ปริมาณสารสกัดจากยีสต์เท่ากับ 1.0 กรัมต่อลิตร ดังนั้นจึงศึกษาปริมาณสารสกัดจากยีสต์ที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตกรดมะนาวโดย *Candida oleophila* UNN33-3 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาว ซึ่งใช้สารละลายน้ำตาลจากการย่อยกากมันสำปะหลังสดที่ผ่านการล้างน้ำ โดยเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* UNN33-3 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาว(ภาคผนวก ก 2.5) ตามวิธีการทดลองในข้อ 2.3.2.2 แปรผันปริมาณสารสกัดจากยีสต์จาก 0.0 ถึง 3.0 กรัมต่อลิตร เก็บตัวอย่างน้ำหมักที่เวลา 96 ชั่วโมง ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 3-9 และรูปที่ 3-7 พบว่าสารสกัดจากยีสต์มีผลต่อการผลิตกรดมะนาวอย่างมาก การไม่เติมสารสกัดจากยีสต์ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวจะส่งผลให้มีการผลิตกรดมะนาวในปริมาณที่ต่ำมาก แต่สารสกัดจากยีสต์ที่ 1.0 กรัมต่อลิตร จะให้ปริมาณกรดมะนาวสูงสุดเท่ากับ 103.73 กรัมต่อลิตรและมีน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 16.84 กรัมต่อลิตร ส่วนสารสกัดจากยีสต์ที่ปริมาณสูงกว่า 1.0 กรัมต่อลิตร ให้ผลผลิตกรดมะนาวต่ำลง ดังนั้นในการเตรียมอาหารเพื่อผลิตกรดมะนาวในการทดลองต่อไปจะใช้ปริมาณสารสกัดจากยีสต์ที่ 1.0 กรัมต่อลิตร

ตารางที่ 3-9 เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิทริก น้ำหนักเซลล์แห้ง ระดับความหนืด ค่าความเป็นกรด-ด่าง และน้ำตาลกลูโคสที่เหลือ เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* UNN33-3 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวที่มีการแปรผันปริมาณเริ่มต้นของสารสกัดจากยีสต์ ที่ระยะเวลาในการหมัก 96 ชั่วโมง

ปริมาณสารสกัดจากยีสต์ (กรัมต่อลิตร)	ระดับความหนืด	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กลูโคสที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	กรดไอโซซิทริก (กรัมต่อลิตร)	อัตราส่วนกรดมะนาวต่อกรดไอโซซิทริก	ผลผลิตกรดมะนาว (ร้อยละ)
0.0	0	6.2	16.28	16.08	13.90	10.31	1.34	6.82
0.5	0	6.0	16.76	9.14	54.52	5.51	10.59	25.86
1.0	1+	6.1	16.84	8.57	103.73	8.82	11.76	49.06
2.0	0	6.0	18.80	4.27	86.55	8.81	9.82	40.12
3.0	0	6.1	12.32	3.79	76.51	7.70	9.94	35.39

หมายเหตุ ระดับความหนืดเรียงลำดับจากมากไปน้อยดังนี้ 5+ > 4+ > 3+ > 2+ > 1+ > 0 โดยน้ำหมักที่มีความหนืดเท่ากับ 5+ นั้นสามารถคว่ำขวดทดลองรูปชมพู่ได้โดยน้ำหมักไม่ไหล



รูปที่ 3-7 เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิทริก และน้ำหนักเซลล์แห้งเมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* UNN33-3 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวที่มีการแปรผันปริมาณเริ่มต้นของสารสกัดจากยีสต์ ที่ระยะเวลาในการหมัก 96 ชั่วโมง

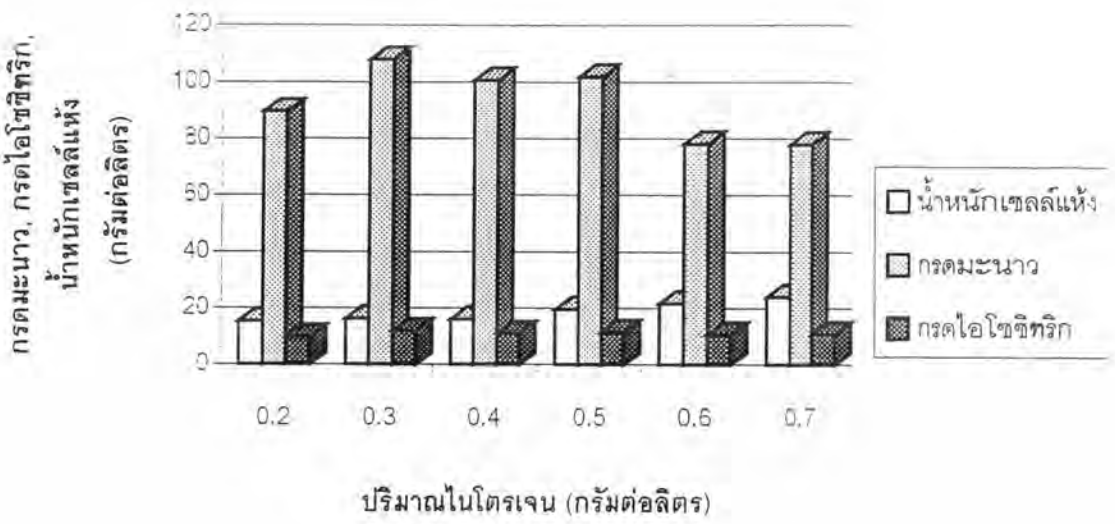
3.3.3 ปริมาณไนโตรเจนในแอมโมเนียมคลอไรด์ที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดมะนาว

ปริมาณไนโตรเจนมีความสำคัญต่อการเจริญของยีสต์และการผลิตกรดมะนาวเป็นอย่างมาก เนื่องจากยีสต์ต้องใช้ไนโตรเจนในการสร้างส่วนประกอบของเซลล์แต่การผลิตกรดมะนาวจะเกิดขึ้นหลังจากมีการใช้ไนโตรเจนหมดแล้ว (Kubicek and Rohr, 1986) จึงทำการศึกษาปริมาณไนโตรเจนในแอมโมเนียมคลอไรด์ที่เหมาะสมในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวเภาคผนวก ก 2.5) โดยทำการแปรผันปริมาณเริ่มต้นของไนโตรเจนที่ 0.2 ถึง 0.7 กรัมต่อลิตร ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 3-10 และรูปที่ 3-8 พบว่าที่เวลาการหมัก 96 ชั่วโมงได้ผลผลิตกรดมะนาวสูงสุดเท่ากับ 107.84 กรัมต่อลิตร โดยใช้ปริมาณไนโตรเจนเท่ากับ 0.3 กรัมต่อลิตรหรือเทียบเท่ากับปริมาณแอมโมเนียมคลอไรด์ 1.15 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้จะเห็นได้ว่าปริมาณไนโตรเจนที่สูงเกินไปจะส่งผลให้ยีสต์เจริญได้ดีแต่ให้ปริมาณกรดมะนาวต่ำลง ดังนั้นจึงเลือกใช้ปริมาณไนโตรเจนเท่ากับ 0.3 กรัมต่อลิตร ในการเตรียมอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวต่อไป

ตารางที่ 3-10 เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิทริก น้ำหนักเซลล์แห้ง ระดับความหนืด ค่าความเป็นกรด-ด่าง และน้ำตาลกลูโคสที่เหลือ ซึ่งได้จากการเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* UNN33-3 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวที่มีการแปรผันปริมาณไนโตรเจนในแอมโมเนียมคลอไรด์ ที่ระยะเวลาในการหมัก 96 ชั่วโมง

ปริมาณไนโตรเจน (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณ NH_4Cl (กรัมต่อลิตร)	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กลูโคสที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	กรดไอโซซิทริก (กรัมต่อลิตร)	อัตราส่วนกรดมะนาวต่อกรดไอโซซิทริก	ผลผลิตกรดมะนาว (ร้อยละ)
0.2	0.7643	6.34	15.32	15.10	89.54	9.84	9.10	43.70
0.3	1.1466	6.25	16.24	13.75	107.84	11.82	9.12	52.29
0.4	1.5287	6.29	16.16	14.25	100.56	11.04	9.11	48.87
0.5	2.0000	6.21	19.68	14.73	101.92	11.41	8.93	49.65
0.6	2.2930	6.15	21.68	13.37	78.18	10.61	7.37	37.84
0.7	2.6750	6.10	24.00	13.85	77.88	10.86	7.17	37.78

หมายเหตุ ระดับความหนืดเป็น 0 ทุกตัวอย่าง



รูปที่ 3-8 เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิทริก และน้ำหนักเซลล์แห้งเมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* UNN33-3 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวที่มีการแปรผันปริมาณไนโตรเจนในแอมโมเนียมคลอไรด์ ที่ระยะเวลาในการหมัก 96 ชั่วโมง

3.3.4 ปริมาณโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดมะนาว

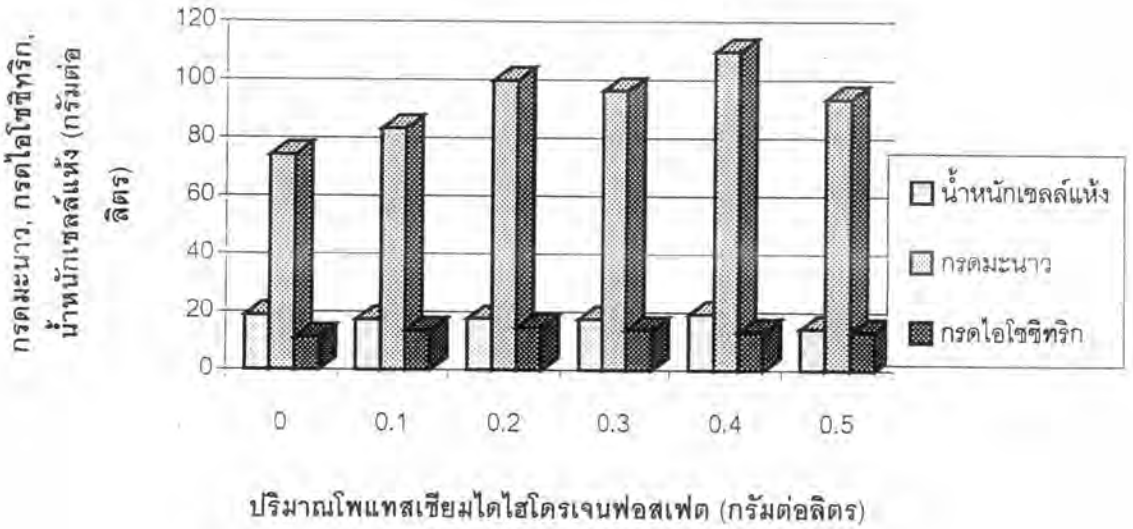
ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวจำเป็นต้องมีฟอสฟอรัสเป็นองค์ประกอบ เนื่องจากมีความสำคัญต่อการเจริญและการผลิตกรดมะนาวของยีสต์ ซึ่งฟอสฟอรัสที่นิยมใช้คือ โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต จากเดิมที่ใช้สารละลายน้ำตาลจากการย่อยแป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน มีปริมาณโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวเท่ากับ 0.2 กรัมต่อลิตร ในการทดลองนี้จะได้หาปริมาณโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดมะนาว โดยใช้สารละลายน้ำตาลจากการย่อยกากมันสำปะหลังสดที่ผ่านการล้างน้ำแล้ว

ทำการเลี้ยง *Candida oleophila* UNN33-3 ในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ (ภาคผนวก ก 1.1) จนหัวเชื้อมีอายุ 15 ชั่วโมง นำมาเลี้ยงในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาว (ภาคผนวก ก 2.5) แปรผันปริมาณเริ่มต้นของโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวเท่ากับ 0.0 ถึง 0.5 กรัมต่อลิตร เก็บตัวอย่างน้ำหมักที่ 96 ชั่วโมง ได้ผลดังตารางที่ 3-11 และรูปที่ 3-9 จากการทดลองพบว่า ปริมาณโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตที่ 0.4 กรัมต่อลิตร ให้ผลผลิตกรดมะนาวได้สูงกว่าที่ระดับอื่นๆ คือ ผลิตกรดมะนาวได้เท่ากับ 109.63 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลาการหมัก 96 ชั่วโมง ดังนั้นจะได้ใช้โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตเท่ากับ 0.4 กรัมต่อลิตร ในการผลิตกรดมะนาวต่อไป

ตารางที่ 3-11 เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิทริก น้ำหนักเซลล์แห้ง ระดับความหนืด ค่าความเป็นกรด-ด่าง และน้ำตาลกลูโคสที่เหลือ ซึ่งได้จากการเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* UNN33-3 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวที่มีการแปรผันปริมาณเริ่มต้นของโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ที่ระยะเวลาในการหมัก 96 ชั่วโมง

ปริมาณ KH_2PO_4 (กรัมต่อลิตร)	ระดับความหนืด	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กลูโคสที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	กรดไอโซซิทริก (กรัมต่อลิตร)	อัตราส่วน กรดมะนาวต่อ กรดไอโซซิทริก	ผลผลิต กรดมะนาว (ร้อยละ)
0.0	0	6.02	18.96	16.55	74.01	11.23	6.59	36.38
0.1	0	6.15	17.28	13.34	83.12	13.36	6.22	40.22
0.2	0	6.11	17.64	11.92	99.85	14.52	6.88	47.99
0.3	0	6.26	17.52	10.66	96.25	13.86	6.94	45.98
0.4	0	6.22	19.36	10.15	109.63	13.28	8.26	52.24
0.5	0	6.24	14.28	10.67	93.37	13.19	7.08	44.60

หมายเหตุ ระดับความหนืดเรียงลำดับจากมากไปน้อยดังนี้ 5+ > 4+ > 3+ > 2+ > 1+ > 0 โดยน้ำหมักที่มีความหนืดเท่ากับ 5+ นั้นสามารถคว่ำขวดทดลองรูปชมพู่ได้โดยน้ำหมักไม่ไหล



รูปที่ 3-9 เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิทริก และน้ำหนักเซลล์แห้งเมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* UNN33-3 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวที่มีการแปรผันปริมาณเริ่มต้นของโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ที่ระยะเวลาในการหมัก 96 ชั่วโมง

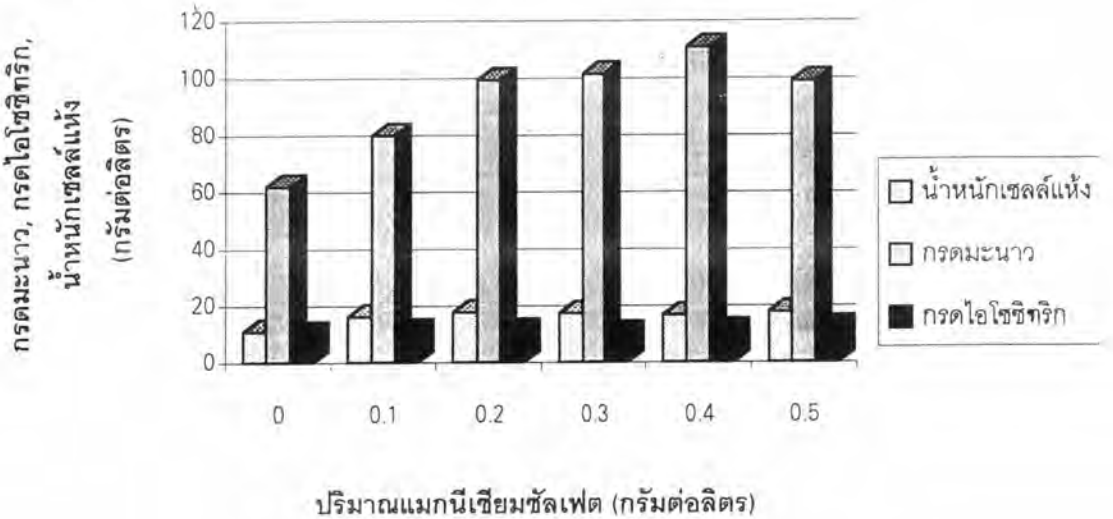
3.3.5 ปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟตและแมงกานีสซัลเฟตที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดมะนาว

แมกนีเซียมและแมงกานีสเป็นแร่ธาตุที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตกรดมะนาวของยีสต์ ตามที่ได้กล่าวแล้วในปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดมะนาวโดยยีสต์ในข้อ 1.4.2.4 สำหรับปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟตและแมงกานีสซัลเพตที่ใช้ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวเดิมซึ่งใช้สารละลายน้ำตาลจากการย่อยแป้งมันสำปะหลังเท่ากับ 0.20 และ 0.25 กรัมต่อลิตรตามลำดับ ในการทดลองนี้จะศึกษาเพื่อหาปริมาณที่เหมาะสมของแมกนีเซียมซัลเฟตและแมงกานีสซัลเฟตในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวที่ใช้สารละลายน้ำตาลจากการย่อยกากมันสำปะหลังสดที่ผ่านการล้างน้ำแล้ว ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยแปรผันปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟตเริ่มต้นที่ 0.0 ถึง 0.5 กรัมต่อลิตร แล้วนำปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟตที่เหมาะสมมาแปรผันร่วมกับปริมาณแมงกานีสซัลเฟตเริ่มต้นที่ 0.0 ถึง 0.55 กรัมต่อลิตร เก็บตัวอย่างที่ 96 ชั่วโมง ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 3-12, 3-13 และรูปที่ 3-10, 3-11 พบว่า *Candida oleophila* UNN33-3 ผลิตกรดมะนาวได้สูงที่สุดเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีแมกนีเซียมซัลเฟตและแมงกานีสซัลเฟตเท่ากับ 0.40 และ 0.45 กรัมต่อลิตรตามลำดับ มีผลผลิตกรดมะนาวเท่ากับ 110.66 และ 109.07 กรัมต่อลิตรตามลำดับ สำหรับการเจริญของเชื้อพบว่า มีน้ำหนักเซลล์แห้งที่ใกล้เคียงกัน ดังนั้นจึงเลือกใช้ปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟตเริ่มต้นที่ 0.40 กรัมต่อลิตรและแมงกานีสซัลเฟตเริ่มต้นที่ 0.45 กรัมต่อลิตร ในการทดลองเปรียบเทียบการผลิตกรดมะนาวโดยใช้อาหารที่ได้ปรับปรุงองค์ประกอบแล้วกับอาหารที่มีปริมาณองค์ประกอบเท่าเดิมต่อไป

ตารางที่ 3-12 เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิทริก น้ำหนักเซลล์แห้ง ระดับความหนืด ค่าความเป็นกรด-ด่าง และน้ำตาลกลูโคสที่เหลือ ซึ่งได้จากการเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* UNN33-3 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวที่มีการแปรผันปริมาณเริ่มต้นของแมกนีเซียมซัลเฟตที่ระยะเวลาในการหมัก 96 ชั่วโมง

ปริมาณ $MgSO_4$ (กรัมต่อลิตร)	ระดับความหนืด	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กลูโคสที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	กรดไอโซซิทริก (กรัมต่อลิตร)	อัตราส่วนกรดมะนาวต่อกรดไอโซซิทริก	ผลผลิตกรดมะนาว (ร้อยละ)
0.0	0	6.05	10.78	10.67	62.01	10.17	6.10	29.62
0.1	0	6.14	16.21	10.15	79.78	11.09	7.19	38.02
0.2	0	6.10	17.74	9.87	99.36	11.21	8.86	47.29
0.3	0	6.12	17.30	9.02	101.39	10.29	9.85	48.06
0.4	0	6.17	16.50	9.72	110.66	11.11	9.96	52.63
0.5	0	6.19	17.73	9.22	98.74	12.21	8.09	46.85

หมายเหตุ ระดับความหนืดเรียงลำดับจากมากไปน้อยดังนี้ 5+ > 4+ > 3+ > 2+ > 1+ > 0 โดยน้ำหมักที่มีความหนืดเท่ากับ 5+ นั้นสามารถคว่ำขวดทดลองรูปชมพู่ได้โดยน้ำหมักไม่ไหล

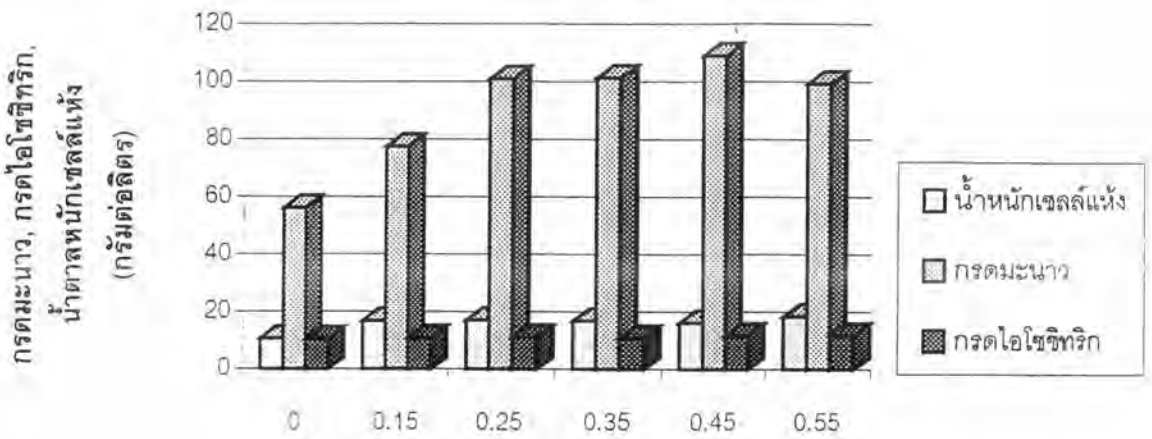


รูปที่ 3-10 เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิทริก และน้ำหนักเซลล์แห้งเมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* UNN33-3 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวที่มีการแปรผันปริมาณเริ่มต้นของแมกนีเซียมซัลเฟต ที่ระยะเวลาในการหมัก 96 ชั่วโมง

ตารางที่ 3-13 เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิทริก น้ำหนักเซลล์แห้ง ระดับความหนืด ค่าความเป็นกรด-ด่าง และน้ำตาลกลูโคสที่เหลือ ซึ่งได้จากการเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* UNN33-3 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวที่มีการแปรผันปริมาณเริ่มต้นของแมงกานีสซัลเฟต ที่ระยะเวลาในการหมัก 96 ชั่วโมง

ปริมาณ $MnSO_4$ (กรัมต่อลิตร)	ระดับความหนืด	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กลูโคสที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	กรดไอโซซิทริก (กรัมต่อลิตร)	อัตราส่วนกรดมะนาวต่อกรดไอโซซิทริก	ผลผลิตกรดมะนาว (ร้อยละ)
0.00	0	6.10	10.64	10.50	56.15	10.52	5.34	26.80
0.15	0	5.91	16.96	10.17	77.55	10.90	7.11	36.96
0.25	0	5.90	17.20	9.02	100.99	11.26	8.97	47.87
0.35	0	5.84	17.00	9.19	101.42	10.88	9.32	48.11
0.45	0	5.86	16.16	8.48	109.07	11.80	9.34	51.56
0.55	0	5.84	18.56	9.81	99.40	11.87	8.37	47.29

หมายเหตุ ระดับความหนืดเรียงลำดับจากมากไปน้อยดังนี้ 5+ > 4+ > 3+ > 2+ > 1+ > 0 โดยน้ำหมักที่มีความหนืดเท่ากับ 5+ นั้นสามารถคว่ำขวดทดลองรูปชมพู่ได้โดยน้ำหมักไม่ไหล



รูปที่ 3-11 เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิทริก และน้ำหนักเซลล์แห้งเมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* UNN33-3 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวที่มีการแปรผันปริมาณเริ่มต้นของแมงกานีสซัลเฟต ที่ระยะเวลาในการหมัก 96 ชั่วโมง

3.3.6 การผลิตกรดมะนาวในอาหารที่ได้ปรับปรุงปริมาณองค์ประกอบแล้วเทียบกับอาหารที่มีปริมาณองค์ประกอบเท่าเดิม (สินีนาถ, 2539)

จากการแปรผันปริมาณสารต่างๆที่เป็นองค์ประกอบในอาหารสำหรับเลี้ยงยีสต์เพื่อผลิตกรดมะนาวในการทดลองที่ผ่านมาได้ปริมาณสารอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดมะนาวโดยใช้สารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังสดที่ผ่านการล้างน้ำ ในการทดลองนี้จะเปรียบเทียบการผลิตกรดมะนาวโดยใช้อาหาร 3 สูตร คือ อาหารที่ใช้แป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์เป็นแหล่งคาร์บอน (เชาวรีย์, 2539) ตามภาคผนวก ก 2.1 อาหารที่ใช้กากมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยกรดซัลฟิวริก สูตรเดิม (สินีนาถ, 2539) ตามภาคผนวก ก 2.2 และอาหารที่ใช้กากมันสำปะหลังสดที่ผ่านการล้างน้ำและย่อยด้วยกรดซัลฟิวริก สูตรใหม่ที่ปรับปรุงในงานวิจัยนี้ ตามภาคผนวก ก 2.6 ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 3-14 และรูปที่ 3-12 พบว่าอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวที่ใช้สารละลายน้ำตาลจากการย่อยแป้งมันสำปะหลังให้ผลผลิตกรดมะนาวสูงที่สุดและอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวที่ใช้สารละลายน้ำตาลจากการย่อยกากมันสำปะหลังสดผ่านการล้างน้ำที่ปรับปรุงองค์ประกอบแล้วจะให้ปริมาณกรดมะนาวและอัตราส่วนกรดมะนาวต่อกรดไอโซซิทริกที่สูงกว่าอาหารที่มีปริมาณองค์ประกอบเท่าเดิม โดยในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวที่ปรับปรุงองค์ประกอบแล้วจะมีปริมาณแอมโมเนียมคลอไรด์ 1.15 กรัมต่อลิตร โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.40 กรัมต่อลิตรและแมกนีเซียมซัลเฟต 0.40 กรัมต่อลิตร แมงกานีสซัลเฟต 0.45 กรัมต่อลิตร ส่วนปริมาณกลูโคส สารสกัดจากยีสต์ และแคลเซียมคาร์บอเนตยังคงใช้ปริมาณเท่าสูตรเดิม ดังนั้นจะได้ใช้อาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวที่ได้ปรับปรุงองค์ประกอบแล้วนี้ในการผลิตกรดมะนาวระดับถังหมักขนาด 5 ลิตรต่อไป

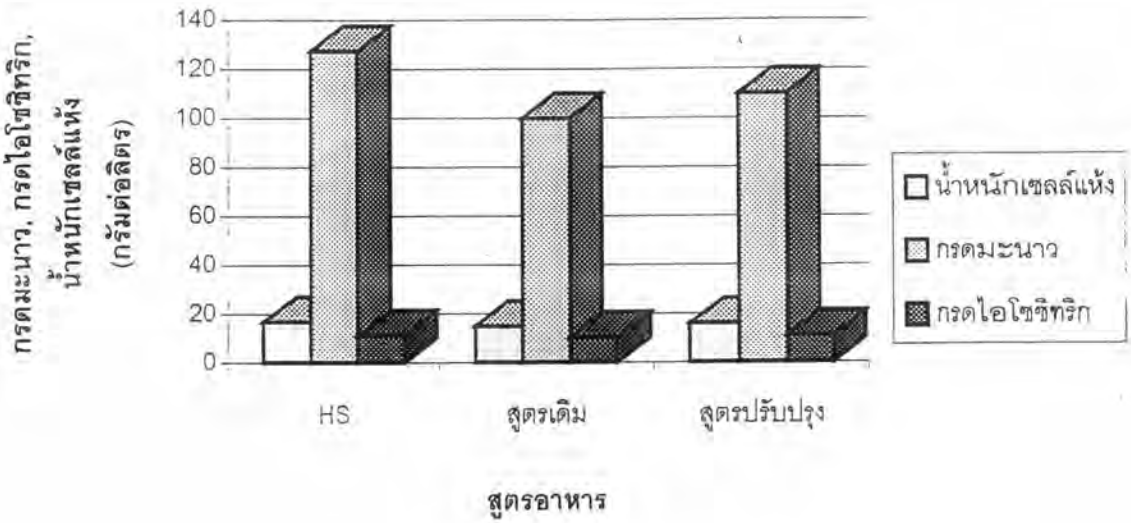
อนึ่งจากผลการทดลองนี้พบว่าน้ำหมักที่ได้จากการใช้สารละลายน้ำตาลจากแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์จะมีความหนืดสูงแต่น้ำหมักจากการใช้สารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดซัลฟิวริก จะไม่มีความหนืด

ตารางที่ 3-14 เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิทริก น้ำหนักเซลล์แห้ง ระดับความหนืด ค่าความเป็นกรด-ด่าง และน้ำตาลกลูโคสที่เหลือ ซึ่งได้จากการ เลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* UNN33-3 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวที่ใช้สารละลายน้ำตาลจากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง อาหารที่ใช้สารละลายน้ำตาลจากการย่อยกากมันสำปะหลัง และอาหารที่มีการปรับปรุงองค์ประกอบแล้ว ที่ระยะเวลาในการหมัก 96 ชั่วโมง

สูตรอาหารที่ใช้	ระดับความหนืด	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กลูโคสที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	กรดไอโซซิทริก (กรัมต่อลิตร)	อัตราส่วนกรดมะนาวต่อกรดไอโซซิทริก	ผลผลิตกรดมะนาว (ร้อยละ)
HS	4+	5.93	16.82	20.22	127.19	11.25	11.31	63.67
สูตรเดิม	0	6.40	14.85	16.96	99.72	10.21	9.77	49.11
สูตรปรับปรุง	0	6.46	16.06	10.39	109.71	10.80	10.16	52.34

หมายเหตุ 1. ระดับความหนืดเรียงลำดับจากมากไปน้อยดังนี้ 5+ > 4+ > 3+ > 2+ > 1+ > 0 โดยน้ำหมักที่มีความหนืดเท่ากับ 5+ นั้นสามารถคว่ำขวดทดลองรูปชมพู่ได้โดยน้ำหมักไม่ไหล

2. HS หมายถึง สารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์



รูปที่ 3-12 เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิทริก และน้ำหนักเซลล์แห้งเมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* UNN33-3 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวที่ใช้สารละลายน้ำตาลจากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง อาหารที่ใช้สารละลายน้ำตาลจากการย่อยกากมันสำปะหลัง และอาหารที่มีการปรับปรุงองค์ประกอบแล้ว ที่ระยะเวลาในการหมัก 96 ชั่วโมง

3.4 การผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 5 ลิตร เมื่อใช้สารละลายน้ำตาลจากการย่อยกากมันสำปะหลังสดที่ผ่านการล้างน้ำและมีปริมาณองค์ประกอบในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวตามที่ได้ปรับปรุงแล้ว

จากการทดลองที่ 3.3.6 พบว่าอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวที่ได้ปรับปรุงองค์ประกอบแล้วให้ผลผลิตกรดมะนาวที่สูงกว่าอาหารที่มีปริมาณองค์ประกอบเท่าเดิม ในการทดลองต่อไปจะได้ทำการขยายระดับการผลิตเป็นถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยคาดว่าจะสามารถเพิ่มผลผลิตกรดมะนาวให้สูงขึ้นได้เนื่องจากมีระบบการกวนและการให้อากาศรวมทั้งการควบคุมความเข้มข้นของน้ำตาลในระหว่างการหมักเพื่อไม่ให้ความเข้มข้นของสารละลายน้ำตาลที่สูงเกินไปเป็นปัจจัยในการยับยั้งการเจริญและการผลิตกรดมะนาวของยีสต์ (Moresi, 1994)

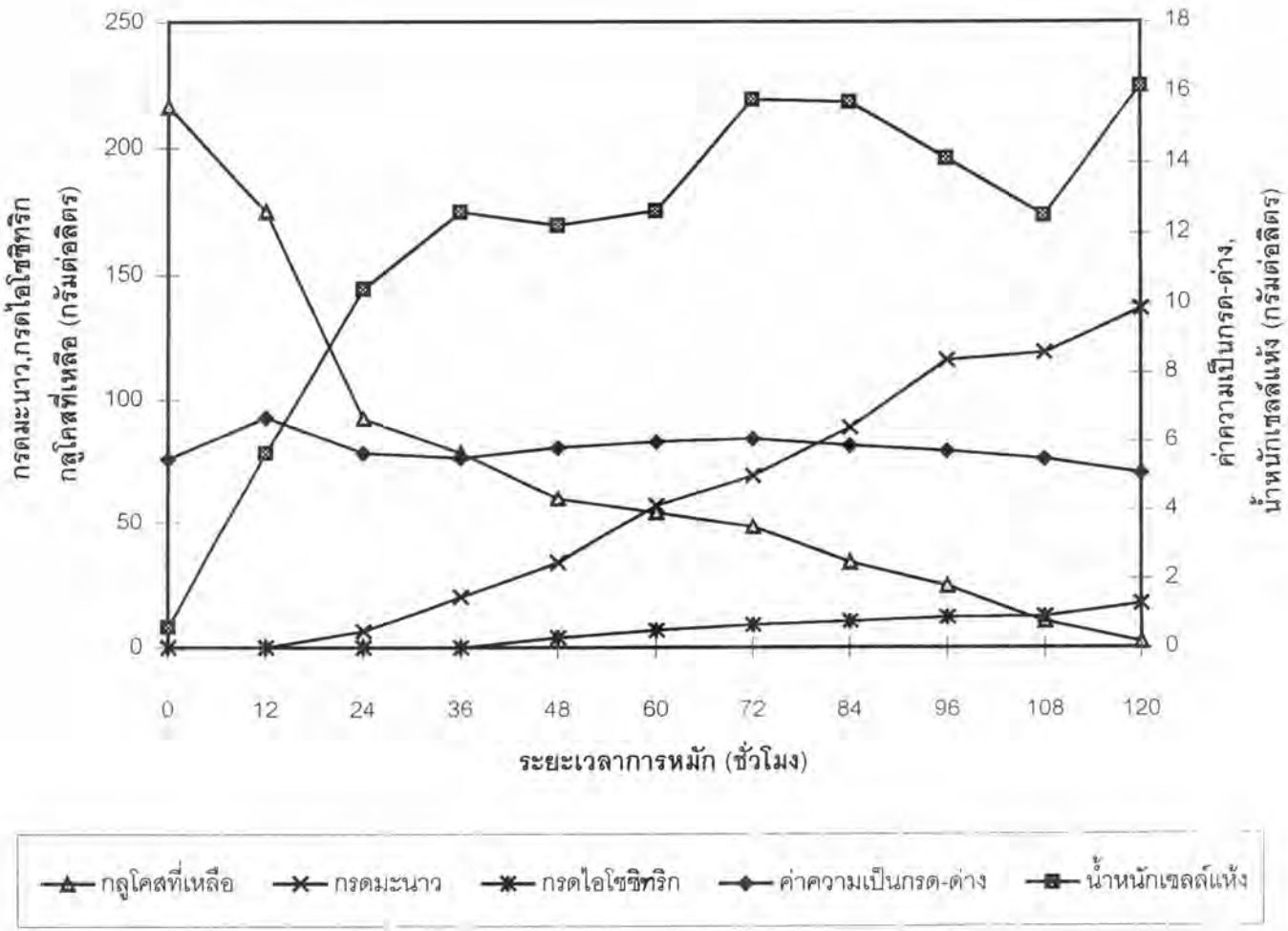
3.4.1 การเจริญและการผลิตกรดมะนาวโดย *Candida oleophila* UNN33-3 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

ทำการเลี้ยง *Candida oleophila* UNN33-3 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาว (ภาคผนวก ก 2.7) ตามวิธีการทดลองในข้อ 2.3.2.3 ของการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดมะนาว เก็บตัวอย่างน้ำหมักทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 120 ชั่วโมง ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 3-15และรูปที่ 3-13, 3-14 พบว่าใน 24 ชั่วโมงแรก ยีสต์มีการเจริญและมีการใช้น้ำตาลกลูโคสอย่างรวดเร็ว เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง จะมีการใช้น้ำตาลเพื่อผลิตกรดมะนาวและมีการสร้างกรดมะนาวอย่างรวดเร็วจนถึงชั่วโมงที่ 96 การผลิตกรดมะนาวจึงเริ่มช้าลง ได้ปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิทริกและอัตราส่วนกรดมะนาวต่อกรดไอโซซิทริกสูงกว่าในระดับขวดเขย่า โดยปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้เท่ากับ 115.91 กรัมต่อลิตร ที่ 96 ชั่วโมง และได้ปริมาณกรดมะนาวสูงสุดเท่ากับ 136.81 กรัมต่อลิตร ในการหมักที่ 120 ชั่วโมง ในด้านการเจริญของเชื้อพบว่าได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 16.16 กรัมต่อลิตร และน้ำหมักที่ได้มีความหนืดน้อยมาก ที่เวลาการหมัก 120 ชั่วโมง ค่าสัมประสิทธิ์ของผลผลิต (Y p/s) ที่ 96 และ 120 ชั่วโมงเท่ากับ 0.60 และ 0.64 ตามลำดับ

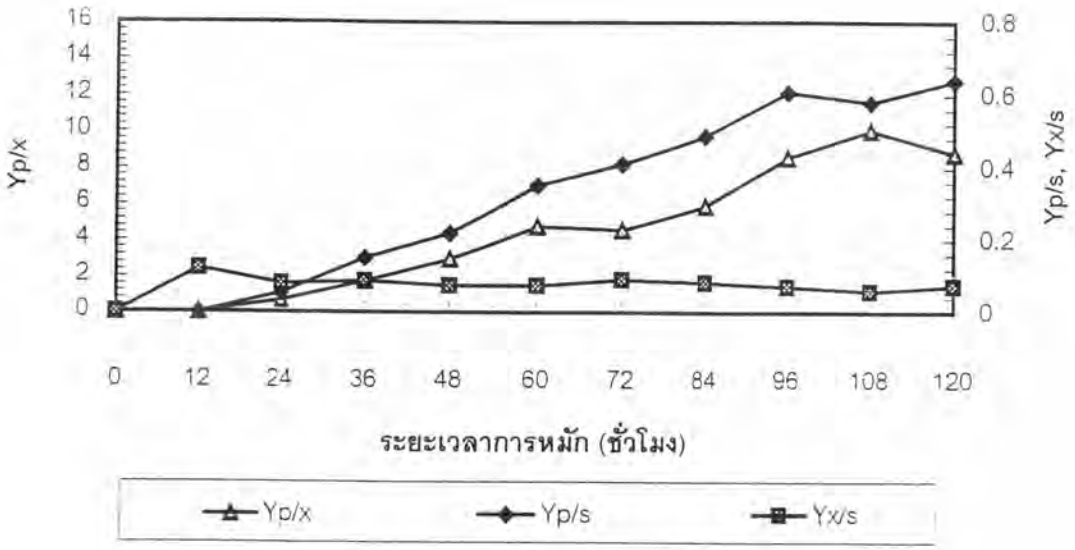
ตารางที่ 3-15 ปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิทริก น้ำหนักเซลล์แห้ง ระดับความหนืด ค่าความเป็นกรด-ด่าง น้ำตาลกลูโคสที่เหลือ ค่า Yp/s Yx/s Yp/x ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* UNN33-3 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาว ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

ระยะเวลาการหมัก (ชั่วโมง)	ระดับความหนืด	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กลูโคสที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	กรดไอโซซิทริก (กรัมต่อลิตร)	อัตราส่วนกรดมะนาวต่อกรดไอโซซิทริก	Yp/s	Yx/s	Yp/x
0	0	5.46	0.61	216.04	-	-	-	0.00	0.00	0.00
12	0	6.69	5.64	174.51	-	-	-	0.00	0.121	0.00
24	0	5.65	10.40	92.50	6.56	-	-	0.053	0.079	0.670
36	0	5.50	12.56	78.50	20.83	-	-	0.151	0.087	1.743
48	0	5.80	12.20	60.00	34.04	3.88	8.77	0.218	0.074	2.937
60	0	5.97	12.60	54.09	56.88	6.79	8.37	0.351	0.074	4.744
72	0	6.06	15.76	48.06	69.04	9.24	7.47	0.411	0.090	4.557
84	0	5.86	15.70	34.04	88.86	10.72	8.29	0.488	0.083	5.889
96	0	5.70	14.12	24.83	115.91	12.25	9.38	0.606	0.071	8.850
108	0	5.46	12.48	10.54	119.05	12.75	9.34	0.579	0.058	10.030
120	1+	5.06	16.16	2.30	136.81	18.11	7.55	0.640	0.073	8.798

หมายเหตุ – หมายถึง มีปริมาณน้อยมากจนไม่สามารถวิเคราะห์ได้ด้วย HPLC



รูปที่ 3-13 ปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิทริก น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรด-ด่าง และการใช้น้ำตาลกลูโคสในระยะเวลาต่าง ๆ ของการผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อ *Candida oleophila* UNN33-3 ในสูตรอาหารซึ่งใช้สารละลายน้ำตาลจากการย่อยกากมันสำปะหลังสดที่ผ่านการล้างน้ำ และมีการปรับปรุงองค์ประกอบแล้ว ในถังหมักขนาด 5 ลิตร



รูปที่ 3-14 ค่า $Y_{p/s}$, $Y_{x/s}$ และ $Y_{p/x}$ ในระยะต่างๆของการผลิตกรดมะนาว โดย *Candida oleophila* UNN33-3 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

3.4.2 ผลการควบคุมระดับความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสในถังหมักต่อการผลิตกรดมะนาว

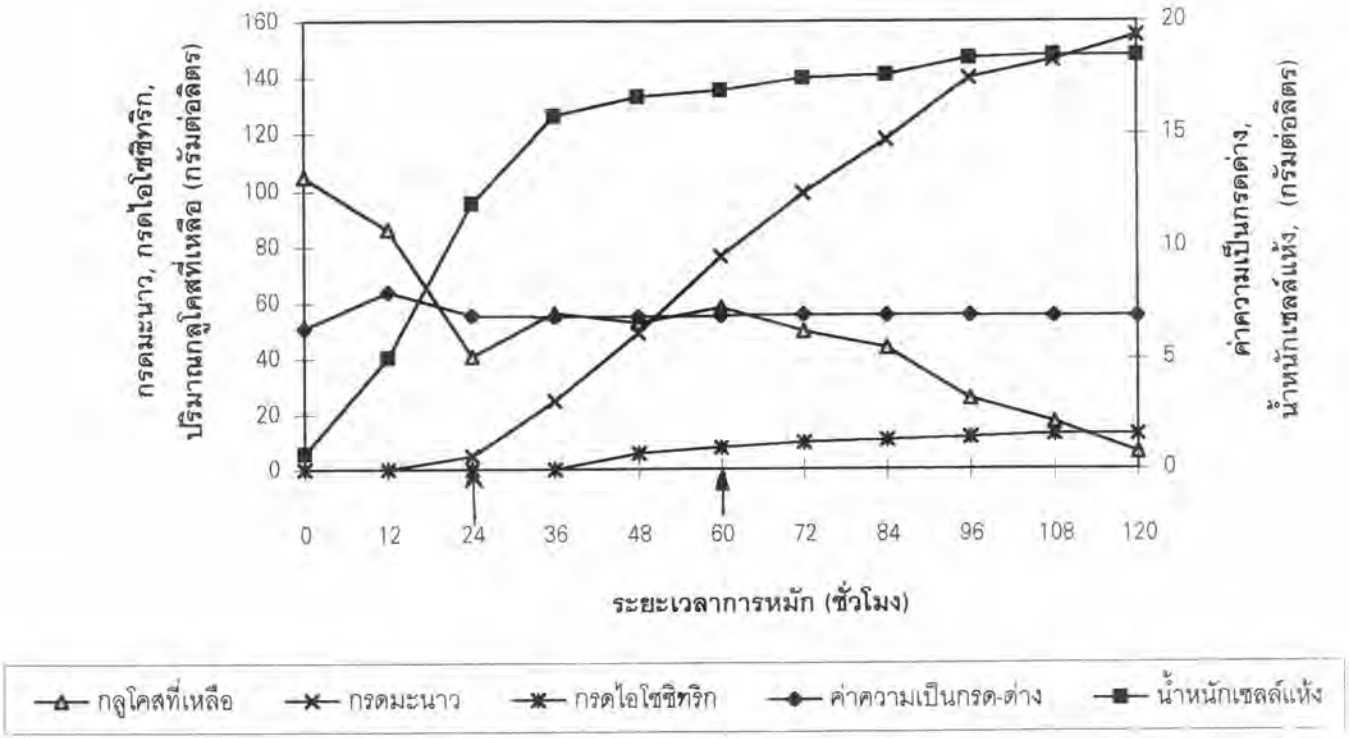
จากการทดลองในถังหมักขนาด 5 ลิตร ซึ่งใช้อาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวที่ปรับปรุงปริมาณสารอาหารแล้ว พบว่าได้ปริมาณกรดมะนาวเท่ากับ 136.81 กรัมต่อลิตร ที่เวลาการหมัก 120 ชั่วโมง ในการทดลองนี้จะทำการควบคุมระดับความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสในระหว่างการหมัก เนื่องจากสารละลายน้ำตาลที่มีความเข้มข้นสูงจะมีผลต่อการผลิตกรดมะนาว หากทำการควบคุมระดับความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นไม่ให้สูงเกินไปแต่เพียงพอต่อการเจริญและการผลิตกรดมะนาวโดยเพิ่มปริมาณกลูโคสทีละน้อยอย่างสม่ำเสมอ อาจทำให้ได้ปริมาณกรดมะนาวสูงขึ้น

ทำการเลี้ยง *Candida oleophila* UNN33-3 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาว (ภาคผนวก ก 2.8) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ตามวิธีการทดลองในข้อ 2.3.2.3 โดยให้ปริมาณอาหารเริ่มต้นในถังหมักเท่ากับ 3 ลิตร ใช้ความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นในถังหมักเท่ากับ 100 กรัมต่อลิตร และเมื่อความเข้มข้นของกลูโคสลดลงระหว่างการหมักจะควบคุมระดับน้ำตาลกลูโคสไว้ประมาณ 50 กรัมต่อลิตร ด้วยการเติมอย่างต่อเนื่องโดยใช้เพริสตอลทิกปั๊มจนปริมาณกลูโคสที่ใช้ไปทั้งหมดเท่ากับ 220 กรัมต่อลิตร ติดตามปริมาณกลูโคสที่เหลือในถังหมักด้วยการวิเคราะห์กลูโคสทุกๆ 3 ชั่วโมง เริ่มทำการเติมน้ำตาลกลูโคสในชั่วโมงที่ 24 ของการหมัก เก็บตัวอย่างน้ำหมัก ทุก 12 ชั่วโมง ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 3-16 และรูปที่ 3-15, 3-16 พบว่าได้ปริมาณกรดมะนาวสูงสุดเท่ากับ 154.96 กรัมต่อลิตร ที่เวลาการหมัก 120 ชั่วโมง มีค่าสัมประสิทธิ์ของผลผลิต (Y p/s) เท่ากับ 0.71

ตารางที่ 3-16 ปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิทริก น้ำหนักเซลล์แห้ง ระดับความหนืด ค่าความเป็นกรด-ด่าง น้ำตาลกลูโคสที่เหลือ ค่า Yp/s Yx/s Yp/x ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* UNN33-3 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาว ในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยควบคุมความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสไว้ประมาณ 50 กรัมต่อลิตร

ระยะเวลาการหมัก (ชั่วโมง)	ระดับความหนืด	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กลูโคสที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	กรดไอโซซิทริก (กรัมต่อลิตร)	อัตราส่วนกรดมะนาวต่อกรดไอโซซิทริก	Yp/s	Yx/s	Yp/x
0	0	6.32	0.73	105.03	-	-	-	0.00	0.00	0.00
12	0	7.98	5.03	86.29	-	-	-	0.00	0.229	0.00
24	0	6.92	11.97	40.71	4.91	-	-	0.076	0.175	0.437
36	0	6.85	15.78	56.10	24.84	-	-	0.266	0.162	1.646
48	0	6.85	16.62	52.38	49.13	5.77	8.51	0.359	0.117	3.078
60	0	6.87	16.92	58.12	76.53	7.95	9.63	0.457	0.097	4.696
72	0	6.94	17.47	49.39	99.11	9.70	10.22	0.563	0.096	5.884
84	0	6.92	17.60	43.67	117.81	10.58	11.14	0.648	0.093	6.940
96	0	6.90	18.36	25.49	139.68	11.47	12.12	0.699	0.089	7.876
108	0	6.89	18.50	17.19	146.23	12.73	11.49	0.702	0.086	8.181
120	0	6.87	18.48	6.08	154.96	12.81	12.10	0.706	0.081	8.679

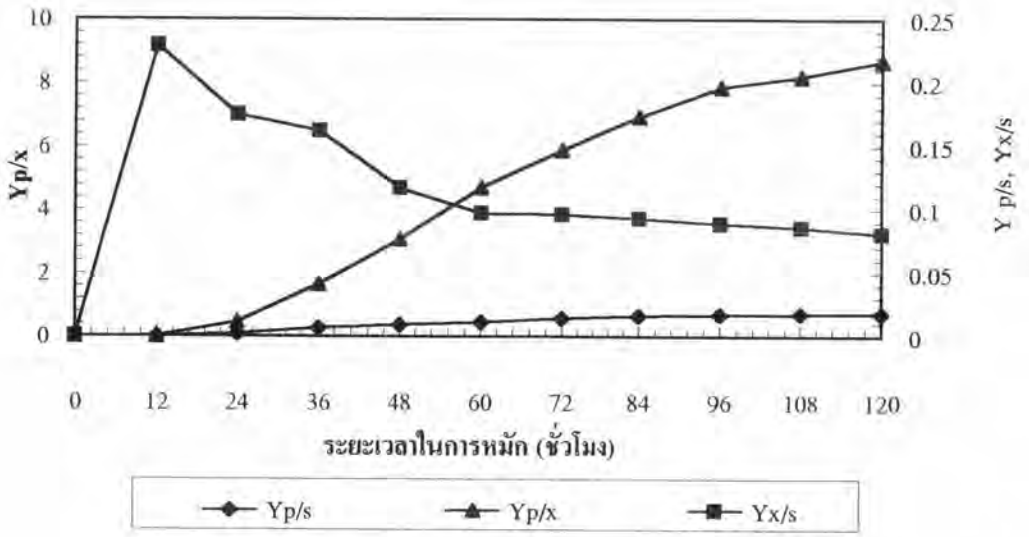
หมายเหตุ – หมายถึง มีปริมาณน้อยมากจนไม่สามารถวิเคราะห์ได้ด้วย HPLC



↑ คือ เวลาที่เริ่มเติมสารละลายน้ำตาลเพื่อรักษาระดับความเข้มข้นเป็น 50 กรัมต่อลิตร

↑ คือ เวลาที่มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในถังหมักเท่ากับ 220 กรัมต่อลิตร

รูปที่ 3-15 ปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิทริก น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรด-ด่างและการใช้น้ำตาลกลูโคสในระยะเวลาต่างๆ ของการผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อ *Candida oleophila* UNN33-3 ในสูตรอาหารที่มีการปรับปรุงองค์ประกอบแล้วและควบคุมความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสไว้ประมาณ 50 กรัมต่อลิตร



รูปที่ 3-16 ค่า $Y_{p/s}$, $Y_{x/s}$ และ $Y_{p/x}$ ในระยะต่างๆของการผลิตกรดมะนาว โดย *Candida oleophila* UNN33-3 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยควบคุมความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสไว้ประมาณ 50 กรัมต่อลิตร