บทที่ 3

ผลการทดลอง

1. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อรา A. niger A185 ในระดับขวดเขย่า

1.1 สมบัติในรูปสมมูลเดกซ์โทรสและปริมาณของแป้งที่ผ่านการย่อยเพื่อใช้เป็นสารแหล่งคาร์บอน

ศยามล นองบุญนาก(2534) ศึกษาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อรา A. niger A185 ในระดับขวดเขย่า พบว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อหนึ่งลิตรประกอบด้วย สารแหล่งคาร์บอน ซึ่งใช้ในรูปของแป้งที่ผ่านการย่อย (ภาคผนวก ง) แอมโมเนียมซัลเฟต 2.5 กรัม โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.4 กรัม ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.4 กรัม แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต 0.3 กรัม ความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเท่ากับ 6.5 โดยควบคุมสภาวะการเลี้ยงเชื้อในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบการเขย่า 250 รอบต่อนาที ซึ่งให้ผลผลิตกรดมะนาวสูง 156 กรัมต่อลิตร ภายในระยะเวลา 7 วัน ต่อมาพบว่า เชื้อรา A. niger A185 ที่ใช้ในการผลิตกรดมะนาวมีลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphology) เปลี่ยนไปอย่างเห็นได้ชัด โดยมีการเปลี่ยนสีของไมซีเลียมจากสีขาวเป็นสีเหลืองนวล และผลผลิตกรดมะนาวลดต่ำลงอย่างมาก จึงต้องทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดมะนาวด้วยเชื้อรา A. niger A185 ใหม่ โดยในลำดับแรกจะศึกษาสารแหล่งคาร์บอน ซึ่งเป็นปัจจัยที่สำคัญที่สุดปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการผลิตกรดมะนาว (Hossain et.al., 1984; Shu and Johnson, 1948; Xu et.al., 1989) โดยศึกษาแป้งที่ผ่านการย่อยเกี่ยวกับสมบัติในรูปสมมูลเดกซ์โทรส และปริมาณของแป้งที่ผ่านการย่อย

1.1.1 สมบัติในรูปสมมูลเดกซ์โทรสของแป้งที่ผ่านการย่อยเพื่อใช้เป็นสารแหล่งคาร์บอน

เลี้ยงเชื้อรา A. niger A185 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาคผนวก ก 3.1) โดยใช้แป้งที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ (ภาคผนวก ง และ รูปที่ 29) ทำการแปรผันสมบัติในรูปสมมูลเดกซ์โทรสของแป้งที่ผ่านการย่อย 3 ลักษณะคือ ใช้แป้งที่ผ่านการย่อยที่มีสมมูลเดกซ์โทรส 85 90 และ 94 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ โดยการควบคุมปริมาณสารแหล่งคาร์บอนในรูปของปริมาณของแข็งทั้งหมดเป็น 200 กรัมต่อลิตร

ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 1 และรูปที่ 4ก 4ข 4ค 5 ตามลำดับ พบว่า เชื้อราที่เจริญในแป้งที่ผ่านการย่อยที่มีสมบัติในรูปสมมูลเดกซ์โทรสต่างกัน ให้ผลผลิตกรดมะนาวแตกต่างกัน โดยเมื่อใช้แป้งที่ผ่านการย่อยที่มีสมมูลเดกซ์โทรส 94 เปอร์เซนต์ จะให้ปริมาณกรดมะนาวสูงสุดคือ 106.9 กรัมต่อลิตร ภายในระยะเวลา 13 วัน ส่วนแป้งที่ผ่านการย่อยที่มีค่าสมมูลต่ำลงมา จะให้ผลผลิตกรดมะนาวต่ำลงมาตามลำดับ นอกจากนี้ ในการหมักโดยใช้แป้งที่ผ่านการย่อยที่มีสมมูลเดกซ์โทรส 85 เปอร์เซนต์เป็นสารแหล่งคาร์บอน การผลิตกรดมะนาวเกิดขึ้นช้ากว่าการหมักเมื่อใช้แป้งที่ผ่านการย่อยที่มีสมมูลเดกซ์โทรส 90 และ 94 เปอร์เซนต์ ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงเลือกใช้แป้งที่ผ่านการย่อยที่มีสมมูลเดกซ์โทรสไม่ต่ำกว่า 94 เปอร์เซนต์

ตารางที่ 1 ผลการแปรผันสมมูลเดกซ์โทรสของแป้งที่ผ่านการย่อย เพื่อใช้เป็นสารแหล่งคาร์บอน ในการผลิตกรดมะนาวโดยใช้เชื้อรา A. niger A185 ในระดับขวดเขย่า โดยการควบคุมปริมาณของแข็งทั้งหมดเป็น 200 กรัมต่อลิตร

สมดุลเดกซ์โทรส(%)	เวลา (วัน)*	พีเอช	น้ำหนักเซลล์ (กรัม/ลิตร)	น้ำตาลทั้งหมด (กรัม/ลิตร)	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัม/ลิตร)	กรดมะนาว (กรัม/ลิตร)	ผลผลิต (%)
85	16	1.7	21.7	13.8	5.9	91.1	52.1
90	13	1.9	17.7	21.8	12.9	97.5	58.0
94	13	1.8	19.0	16.4	10.2	106.9	61.2

* หมายถึง ระยะเวลาที่ผลิตกรดมะนาวได้สูงสุด

รูปที่ 4 ผลของการแปรผันสมมูลเดกซ์โทรสของแป้งที่ผ่านการย่อย เพื่อใช้เป็นสารแหล่งคาร์บอน ในการผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อรา A. niger A185 ในระดับขวดเขย่า โดยการควบคุมปริมาณของแข็งทั้งหมดเป็น 200 กรัมต่อลิตร

ก) สมมูลเดกซ์โทรส 85 เปอร์เซนต์

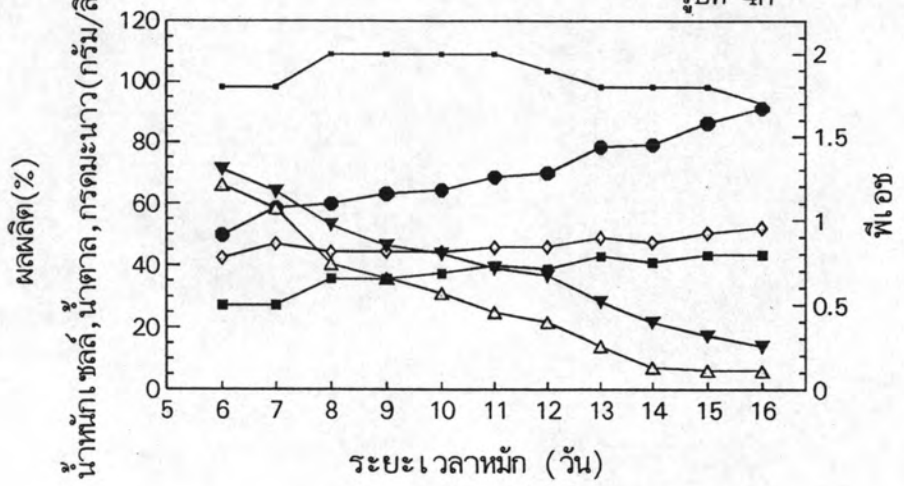
ข) สมมูลเดกซ์โทรส 90 เปอร์เซนต์

ค) สมมูลเดกซ์โทรส 94 เปอร์เซนต์

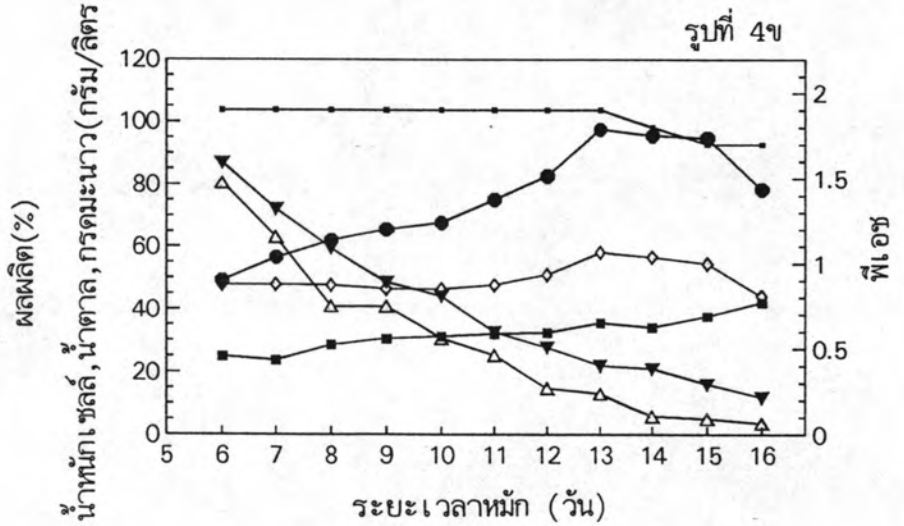
โดยที่

- น้ำหนักเซลล์แห้ง
- น้ำตาลทั้งหมด
- น้ำตาลรีดิวซ์
- กรดมะนาว
- ผลผลิต
- พีเอช

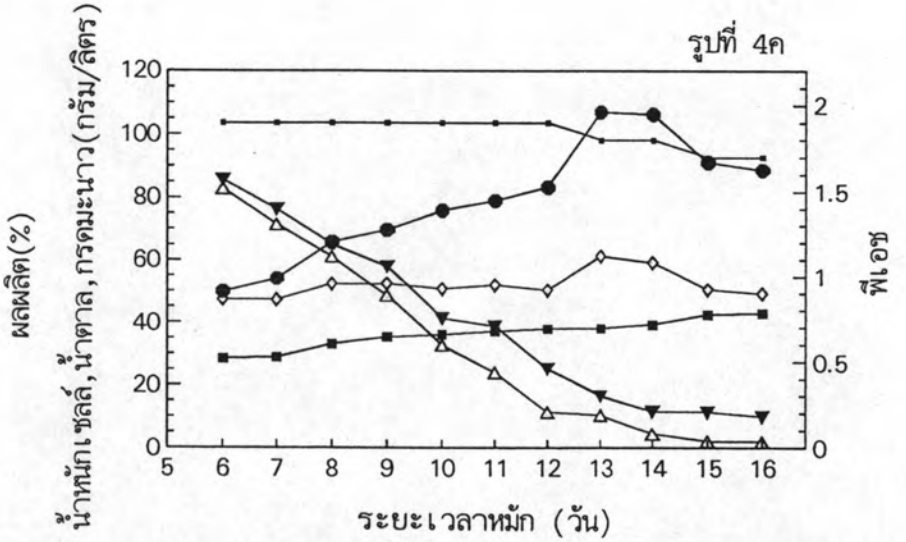
รูปที่ 4ก

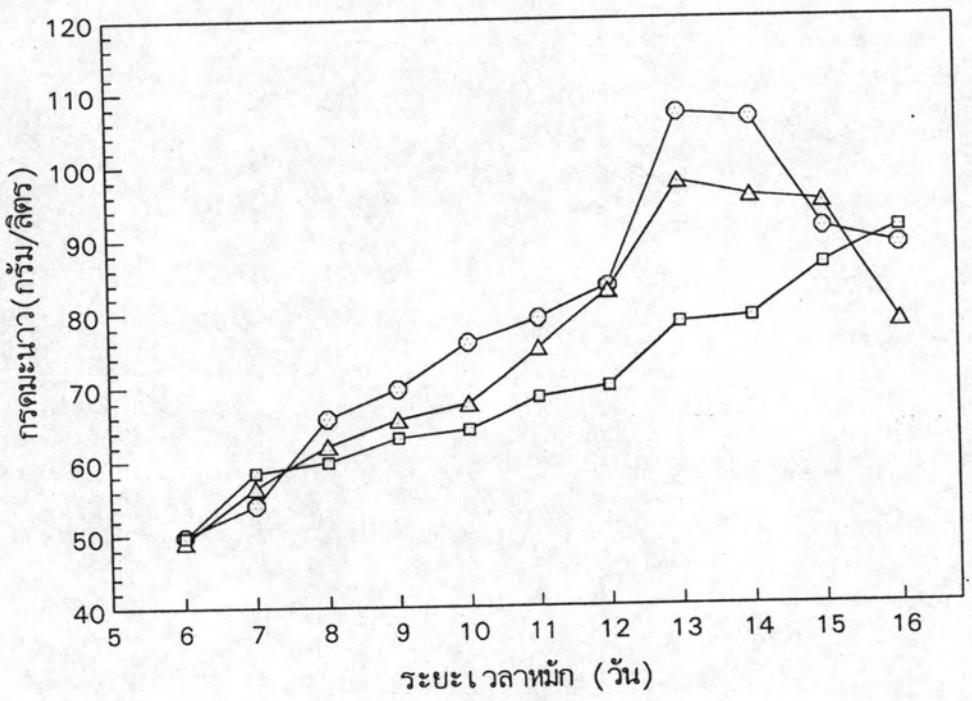


รูปที่ 4ข



รูปที่ 4ค





รูปที่ 5 เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาวที่เกิดขึ้นในการแปรผันสมมูลเดกซ์โทรสของแป้งที่ผ่านการย่อยเป็น 85 90 และ 94 เปอร์เซนต์ เพื่อใช้เป็นสารแหล่งคาร์บอนในการผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อรา A. niger A185 ในระดับขวดเขย่า

โดยที่

-□- สมมูลเดกซ์โทรส 85 เปอร์เซนต์

-△- สมมูลเดกซ์โทรส 90 เปอร์เซนต์

-○- สมมูลเดกซ์โทรส 94 เปอร์เซนต์

1.1.2 ปริมาณที่เหมาะสมของแป้งที่ผ่านการย่อยเพื่อใช้เป็นสารแหล่งคาร์บอน

เลี้ยงเชื้อรา A. niger A185 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาคผนวก ก 3.2) โดยใช้แป้งที่ผ่านการย่อยที่มีสมมูลเดกซ์โทรส 94 เปอร์เซนต์ เป็นสารแหล่งคาร์บอน ทำการแปรผันปริมาณแป้งที่ผ่านการย่อย ในรูปของปริมาณของแข็งทั้งหมดเป็น 180 200 และ 220 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 2 และรูปที่ 6ก 6ข 6ค 7 ตามลำดับ พบว่า เชื้อราที่เจริญในแป้งที่ผ่านการย่อยที่มีปริมาณของแข็งทั้งหมดต่างกัน ให้ผลผลิตกรดมะนาวแตกต่างกัน เมื่อใช้แป้งที่ผ่านการย่อยปริมาณ 200 กรัมของแข็งทั้งหมดต่อลิตร เชื้อราสามารถผลิตกรดมะนาวสูงถึง 106.9 กรัมต่อลิตร ภายในระยะเวลา 13 วัน คิดเป็นผลผลิตเท่ากับ 61.2 เปอร์เซนต์ เทียบกับน้ำตาลทั้งหมดที่ใช้ ในขณะที่เมื่อใช้แป้งที่ผ่านการย่อยปริมาณ 180 กรัมของแข็งทั้งหมดต่อลิตร เชื้อราผลิตกรดมะนาวได้ต่ำเพียง 82.6 กรัมต่อลิตร ทั้งนี้เนื่องจากมีปริมาณน้ำตาลต่ำไม่เพียงพอสำหรับการสร้างกรดมะนาว ซึ่งเห็นได้จากปริมาณน้ำตาลที่เหลือในน้ำหมักมีอยู่ต่ำมาก เมื่อใช้แป้งที่ผ่านการย่อยปริมาณสูง 220 กรัมของของแข็งทั้งหมดต่อลิตร พบว่า เชื้อราผลิตกรดมะนาวได้ต่ำและช้ากว่าเมื่อใช้แป้งที่ผ่านการย่อยปริมาณ 200 กรัมของแข็งทั้งหมดต่อลิตร เนื่องจากมีปริมาณน้ำตาลสูงเกินไป และทำให้มีน้ำตาลเหลือในถังหมักมาก

ตารางที่ 2 ผลการแปรผันปริมาณแป้งที่ผ่านการย่อยที่มีสมมูลเดกซ์โทรส 94 เปอร์เซนต์ เพื่อใช้เป็นสารอาหารแหล่งคาร์บอนในการผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อรา A. niger A185 ในระดับขวดเขย่า

ปริมาณของแข็งทั้งหมด(ก/ล)	เวลา (วัน)*	พีเอช	น้ำหนักเซลล์ (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	ผลผลิต (%)
180	15	1.7	20.0	5.3	1.0	82.6	49.7
200	13	1.8	19.0	16.4	10.2	106.9	61.2
220	14	1.8	19.0	25.6	11.4	102.8	55.9

* ระยะเวลาที่ผลิตกรดมะนาวได้สูงสุด

รูปที่ 6 ผลของการแปรผันปริมาณแป้งที่ผ่านการย่อยในรูปของแข็งทั้งหมดเพื่อใช้เป็นสารแหล่งคาร์บอน ในการผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อรา A. niger A185 ในระดับขวดเขย่า

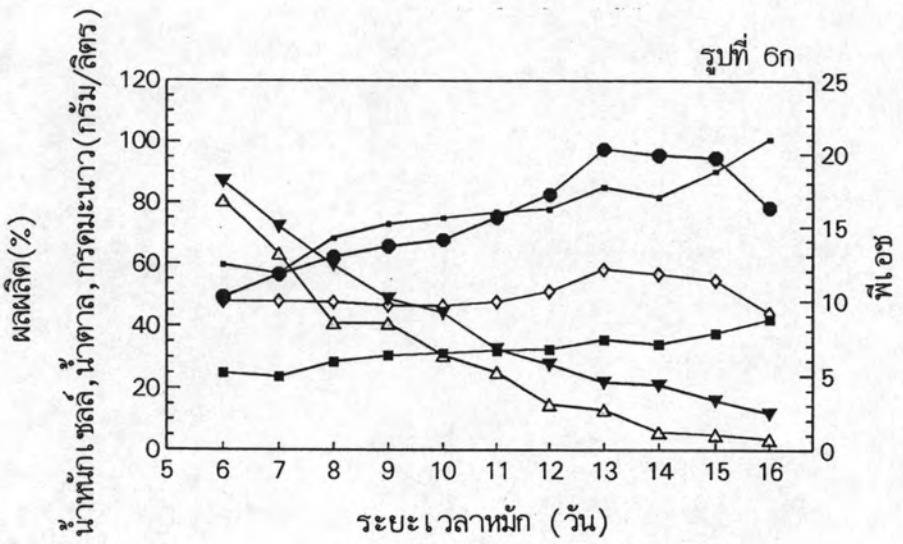
ก) ปริมาณของแข็งทั้งหมด 180 กรัมต่อลิตร

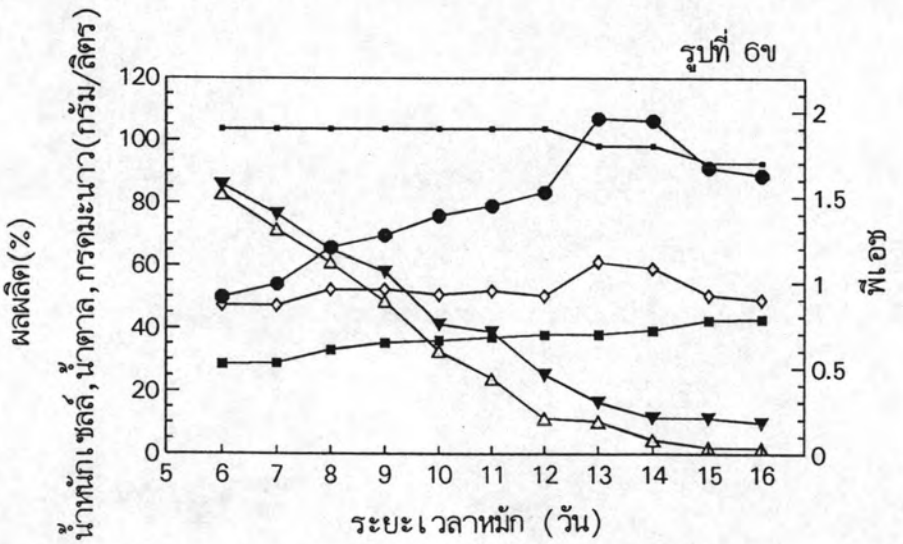
ข) ปริมาณของแข็งทั้งหมด 200 กรัมต่อลิตร

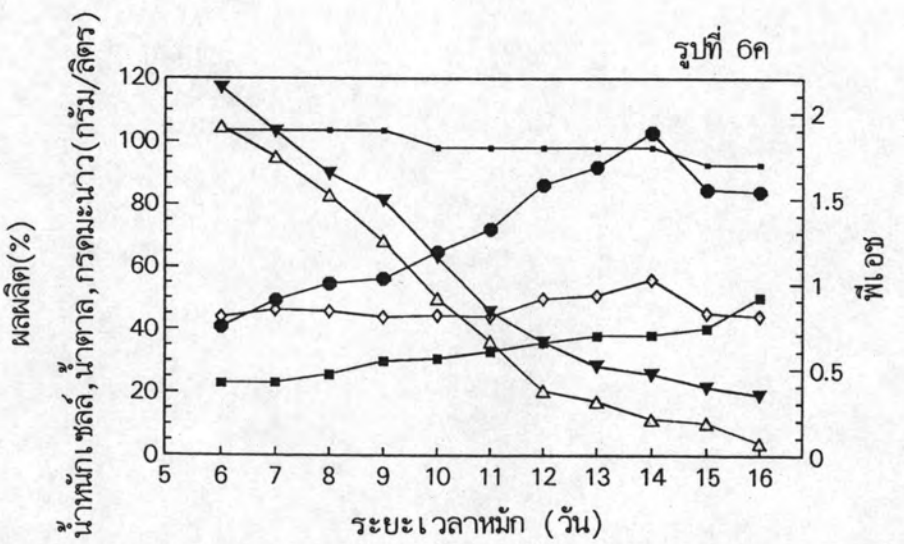
ค) ปริมาณของแข็งทั้งหมด 220 กรัมต่อลิตร

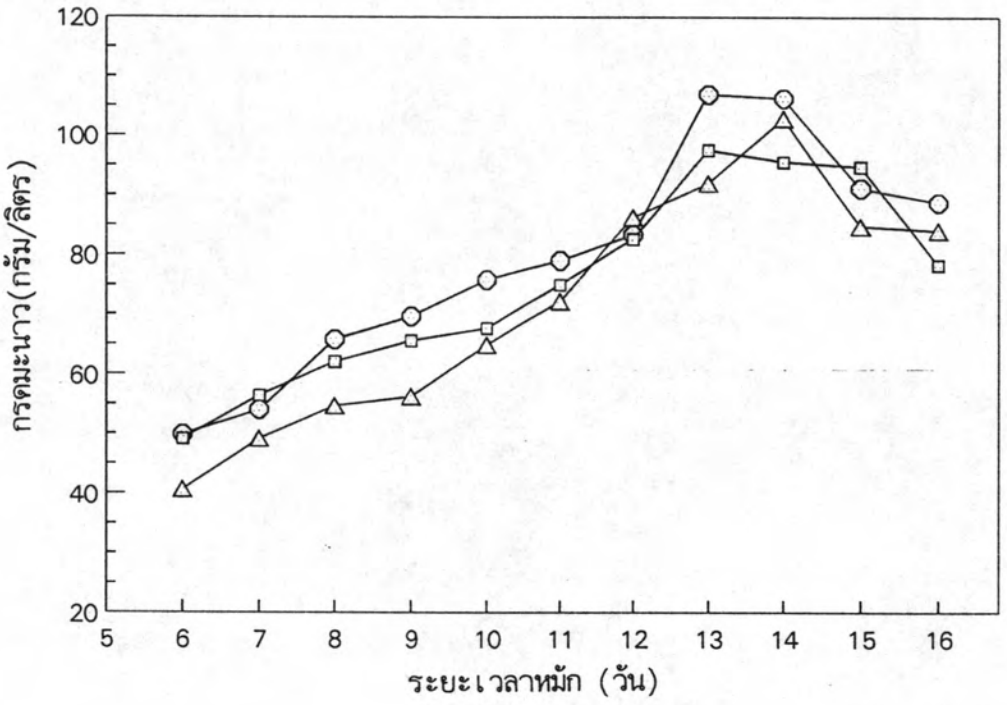
โดยที่

- น้ำหนักเซลล์แห้ง
- น้ำตาลทั้งหมด
- น้ำตาลรีดิวซ์
- กรดมะนาว
- ผลผลิต
- พีเอช


รูปที่ 6ก
ผลผลิต(%)
น้ำหนักเซลล์,น้ำตาล,กรดมะนาว(กรัม/ลิตร)
พีเอช
ระยะเวลาหมัก (วัน)


รูปที่ 6ข
ผลผลิต(%)
น้ำหนักเซลล์,น้ำตาล,กรดมะนาว(กรัม/ลิตร)
พีเอช
ระยะเวลาหมัก (วัน)


รูปที่ 6ค
ผลผลิต(%)
น้ำหนักเซลล์,น้ำตาล,กรดมะนาว(กรัม/ลิตร)
พีเอช
ระยะเวลาหมัก (วัน)



รูปที่ 7 เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาวที่เกิดขึ้นในการแปรผันปริมาณแป้งที่ผ่านการย่อยในรูปของแข็งทั้งหมดเป็น 180 200 และ 220 กรัมต่อลิตร เพื่อใช้เป็นสารแหล่งคาร์บอน ในการผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อรา A. niger A185 ในระดับขวดเขย่า โดยที่

-□- ปริมาณของแข็งทั้งหมด 180 กรัมต่อลิตร

-○- ปริมาณของแข็งทั้งหมด 200 กรัมต่อลิตร

-△- ปริมาณของแข็งทั้งหมด 220 กรัมต่อลิตร

1.2 การแปรผันปริมาณไอออนของทองแดงที่เหมาะสม สำหรับการผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อรา A. niger A185 ในระดับขวดเขย่า

เชื้อแต่ละสายพันธุ์มีความต้องการแร่ธาตุเสริมแตกต่างกันทั้งชนิดและปริมาณ (Marroquin et.al., 1970) แร่ธาตุเสริมที่สำคัญต่อการผลิตกรดมะนาวได้แก่ เหล็ก ทองแดง สังกะสี และแมงกานีส ซึ่งจำเป็นต้องมีปริมาณที่ต่ำเหมาะสมต่อการผลิตกรดมะนาว (Marroquin et.al., 1970; Shu and Johnson, 1948b; Tomlinson et.al., 1950, 1951) สำหรับเชื้อรา A. niger A185 ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ ศยามล นองบุญนาก (2534)ได้รายงานไว้ว่า ทองแดง เหล็ก สังกะสี และแมงกานีส มีผลยับยั้งการผลิตกรดมะนาว แต่เมื่อเชื้อรา A. niger A185 มีการเปลี่ยนลักษณะทางสัณฐานวิทยาอย่างเห็นได้ชัด จึงควรมีการศึกษาผลของแร่ธาตุเสริมใหม่ ซึ่งจากการทดลองที่ทำในงานวิจัยนี้ ซึ่งไม่ได้แสดงข้อมูล พบว่า เหล็ก แมงกานีส และสังกะสี มีผลยับยั้งการผลิตกรดมะนาวอย่างมาก ส่วนทองแดง พบว่า มีผลดีต่อการผลิตกรดมะนาว จึงทำการทดลองแปรผันปริมาณไอออนของทองแดงที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดมะนาว

เลี้ยงเชื้อรา A. niger A185 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาคผนวกก 3.3) ทำการแปรผันปริมาณไอออนของทองแดงเป็น 0 0.5 1.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 3 และรูปที่ 8 ตามลำดับ พบว่า เมื่อใช้ไอออนของทองแดงเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เชื้อราสามารถผลิตกรดมะนาวได้สูง 108.8 กรัมต่อลิตร ภายในระยะเวลา 14 วัน ซึ่งมีค่าสูงใกล้เคียงกับเมื่อไม่มีการเติมไอออนของทองแดง ส่วนเมื่อใช้ไอออนของทองแดงที่มีความเข้มข้นสูงกว่า 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า มีผลยับยั้งการผลิตกรดมะนาว ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงมีการเติมไอออนของทองแดงที่มีความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

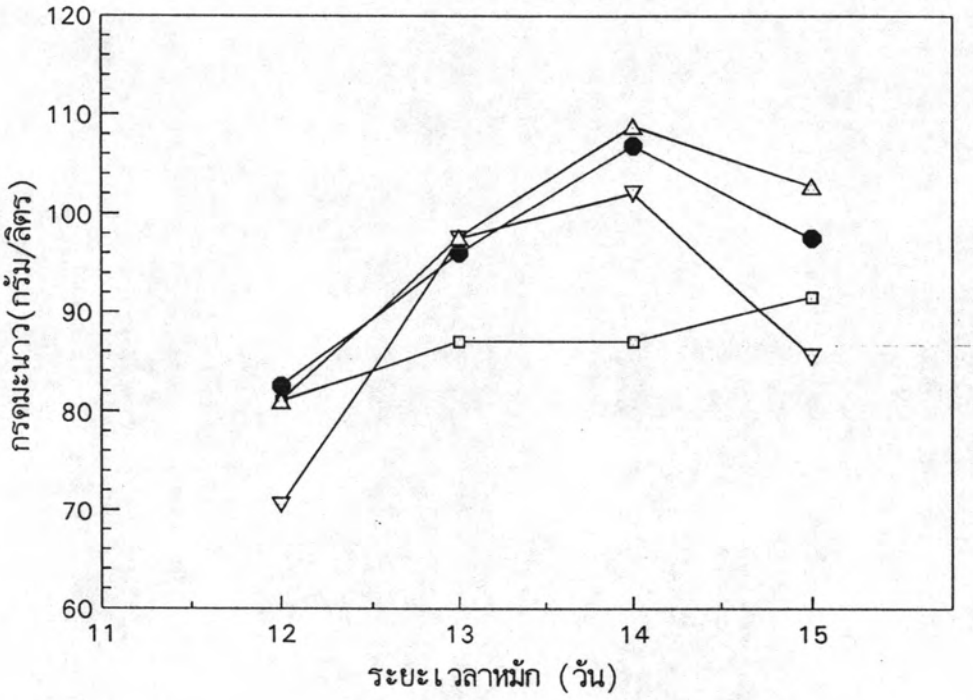
ตารางที่ 3 ผลการแปรผันปริมาณไอออนของทองแดง ในการผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อรา A. niger A185 ในระดับขวดเขย่า

ทองแดงไอออน (มก./ลิตร)	เวลา (วัน)*	พีเอช	น้ำหนักเซลล์ (กรัม/ลิตร)	น้ำตาลทั้งหมด (กรัม/ลิตร)	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัม/ลิตร)	กรดมะนาว (กรัม/ลิตร)	ผลผลิต (%)
0	14	1.7	23.1	9.7	1.8	106.8	59.2
0.5	14	1.7	22.3	8.5	1.0	108.8	59.9
1.0	14	1.7	22.5	7.2	1.0	102.0	55.8
5.0	13	1.7	24.3	15.6	1.2	87.0	49.9

★ ระยะเวลาที่ผลิตกรดมะนาวได้สูงสุด

1.3 อายุของหัวเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อรา A. niger A185 ในระดับขวดเขย่า

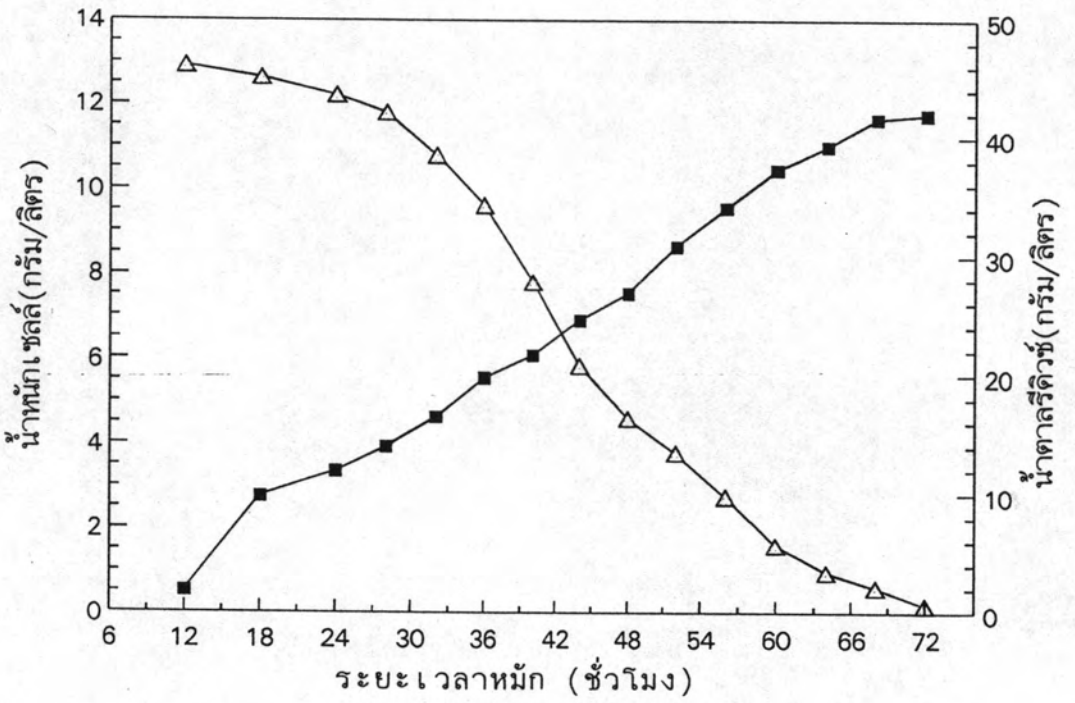
จากผลการทดลองข้อ 1.1 และ 1.2 จะเห็นว่า เชื้อราใช้เวลาในการผลิตกรดมะนาวได้สูงสุดในวันที่ 13-15 ของการหมัก ซึ่งเป็นเวลาที่นานมากสำหรับการหมัก จึงพิจารณาอายุของหัวเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดมะนาว เพื่อหาแนวโน้มที่จะลดระยะเวลาที่ใช้ในการผลิตลง จากรูปที่ 9 แสดงลักษณะการเจริญของหัวเชื้อที่เวลาต่างๆ จะเห็นว่า การเจริญของเชื้อราเข้าสู่ระยะ log phase ที่เวลา 48 ชั่วโมง และเริ่มเข้าสู่ระยะ stationary phase ที่เวลา 72 ชั่วโมง จึงทำการทดลองใช้หัวเชื้อ 3 ระยะคือ หัวเชื้อที่เวลา 48 ชั่วโมง ซึ่งเป็นระยะที่เชื้อมีอัตราการเจริญสูงสุด ระยะ late log phase ที่เวลา 60 ชั่วโมง ซึ่งเป็นระยะที่นิยมใช้เป็นหัวเชื้อมากที่สุด และระยะ stationary phase ที่เวลา 72 ชั่วโมง ซึ่งเป็นระยะที่เชื้อรามีอัตราการเจริญคงที่



รูปที่ 8 เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาวที่เกิดขึ้นในการแปรผันปริมาณไอออนของทองแดงในการผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อรา A. niger A185 ในระดับขวดเขย่า

โดยที่

- ไอออนทองแดง 0.0 ส่วนในล้านส่วน (ชุดควบคุม)
- ไอออนทองแดง 0.5 ส่วนในล้านส่วน
- ไอออนทองแดง 1.0 ส่วนในล้านส่วน
- ไอออนทองแดง 5.0 ส่วนในล้านส่วน



รูปที่ 9 ลักษณะการเจริญของหัวเชื้อที่เวลาต่างๆ

โดยที่

—■— น้ำหนักเซลล์แห้ง

—△— น้ำตาลรีดิวซ์

เลี้ยงเชื้อรา A. niger A185 ในอาหารเลี้ยงหัวเชื้อ (ภาคผนวก ก 2) บ่มไว้นาน 48 60 และ 72 ชั่วโมง ตามลำดับ นำมาใช้เป็นหัวเชื้อสำหรับผลิตกรดมะนาวในอาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาคผนวก ก 3.4) โดยใช้หัวเชื้อปริมาณ 0.6 กรัมต่อลิตร เก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์กรดมะนาวในวันที่ 8-15 ของการหมัก ซึ่งเป็นระยะเวลาที่มีการผลิตกรดมะนาวสูงสุด

ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4 และรูปที่ 10ก 10ข 10ค 11 ตามลำดับ พบว่า เมื่อใช้หัวเชื้อที่มีอายุต่างกัน เชื้อราจะสามารถผลิตกรดมะนาวได้แตกต่างกัน เมื่อใช้หัวเชื้ออายุ 48 ชั่วโมง เชื้อราจะผลิตกรดมะนาวได้สูงสุด 111.6 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 11 ของการหมัก ในขณะที่เมื่อใช้หัวเชื้ออายุ 60 และ 72 ชั่วโมง จะเห็นว่าเชื้อราผลิตกรดมะนาวได้สูงสุด 110.6 และ 108.0 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 12 และ 14 ของการหมัก ตามลำดับ ดังนั้นจึงควรเลือกใช้หัวเชื้ออายุ 48 ชั่วโมงในการทดลองต่อไป เพื่อเป็นการลดระยะเวลาที่ใช้ในการผลิตกรดมะนาว

ตารางที่ 4 ผลการแปรผันอายุของหัวเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาว โดยเชื้อรา A. niger A185 ในระดับขวดเขย่า

อายุหัวเชื้อ (ชั่วโมง)	เวลา (วัน)*	พีเอช	น้ำหนักเซลล์ (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	ผลผลิต (%)
48	11	1.9	23.0	51.2	47.6	111.6	80.0
60	12	1.9	24.5	43.8	35.3	110.6	75.3
72	14	1.9	26.7	24.8	13.5	108.0	65.1

* หมายถึง ระยะเวลาที่ผลิตกรดมะนาวได้สูงสุด

รูปที่ 10 ผลของการแปรผันอายุของหัวเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อรา A. niger A185 ในระดับขวดเขย่า

ก) หัวเชื้ออายุ 48 ชั่วโมง

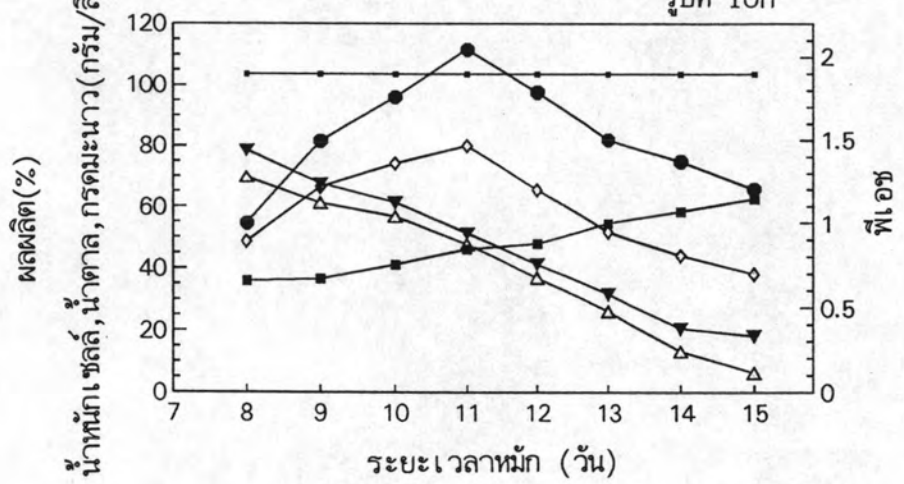
ข) หัวเชื้ออายุ 60 ชั่วโมง

ค) หัวเชื้ออายุ 72 ชั่วโมง

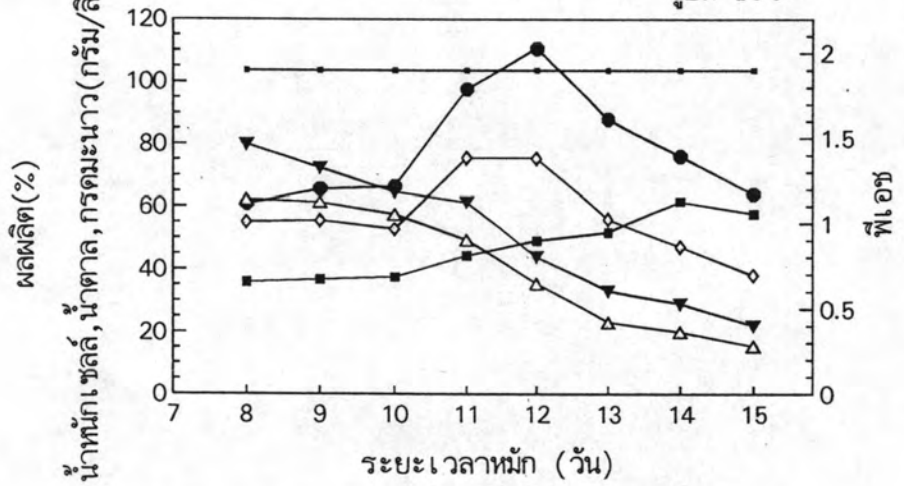
โดยที่

- น้ำหนักเซลล์แห้ง
- น้ำตาลทั้งหมด
- น้ำตาลรีดิวซ์
- กรดมะนาว
- ผลผลิต
- พีเอช

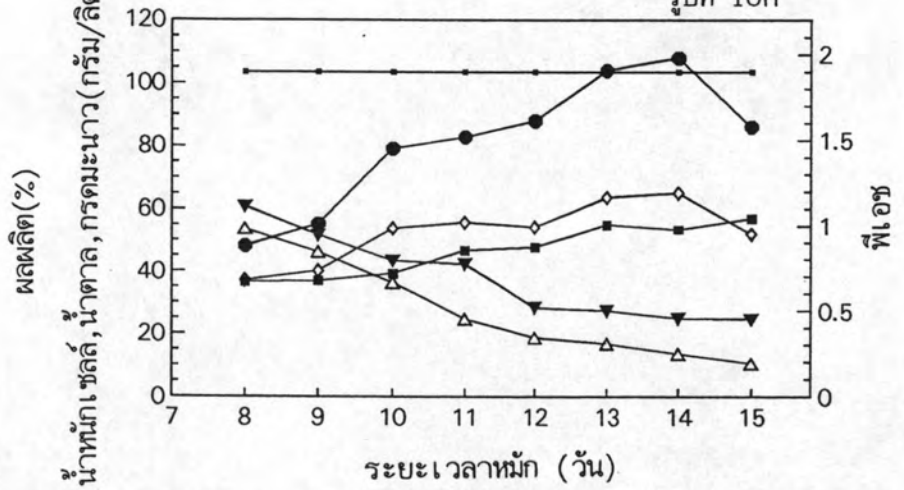
รูปที่ 10ก



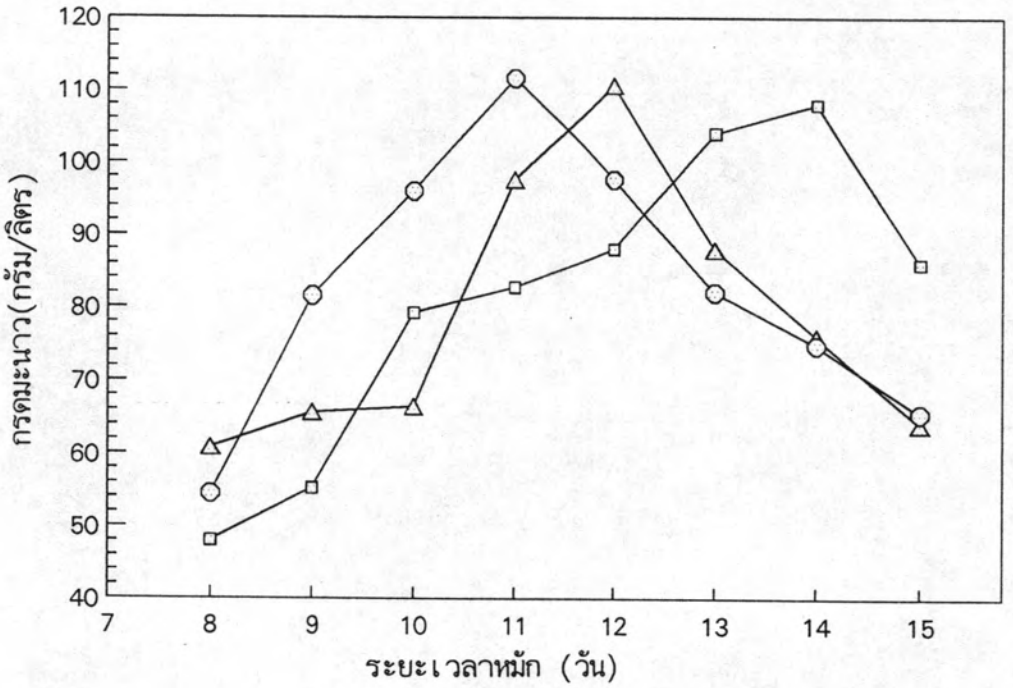
รูปที่ 10ข



รูปที่ 10ค



ม.171845776



รูปที่ 11 เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาวที่เกิดขึ้นในการแปรผันอายุของหัวเชื้อเป็น 48 60 และ 72 ชั่วโมง ในการผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อรา A. niger A185 ในระดับขวดเขย่า

โดยที่

-○- หัวเชื้ออายุ 48 ชั่วโมง

-△- หัวเชื้ออายุ 60 ชั่วโมง

-□- หัวเชื้ออายุ 72 ชั่วโมง

1.4 ผลของการเติมสารไขมันที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อรา A. niger A185 ในระดับขวดเขย่า

Millis และคณะ (1963) รายงานว่า น้ำมันธรรมชาติโดยเฉพาะที่มีไขมันไม่อิ่มตัวในปริมาณสูง สามารถเพิ่มผลผลิตกรดมะนาวได้โดยไม่มีผลต่อน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อรา ดังนั้นในการงานวิจัยนี้ จึงทำการทดลองเติมน้ำมันพืช 3 ชนิดที่สามารถผลิตได้ในประเทศ คือ น้ำมันรำข้าว 100 เปอร์เซนต์ ตราคิง น้ำมันปาล์มโอเลอิน 100 เปอร์เซนต์ ตรามรกต และน้ำมันถั่วเหลือง 100 เปอร์เซนต์ ตราองุ่น พบว่า เมื่อมีการเติมน้ำมันรำข้าวและน้ำมันปาล์มโอเลอิน เชื้อราจะผลิตกรดมะนาวได้ช้ากว่าเมื่อมีการเติมน้ำมันถั่วเหลืองและชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมน้ำมัน (ไม่ได้แสดงข้อมูล) ดังนั้นจึงทำการแปรผันการเติมน้ำมันถั่วเหลืองที่ความเข้มข้น 0 - 3 เปอร์เซนต์ (ปริมาตรโดยปริมาตร)

เลี้ยงเชื้อรา A. niger A185 ในอาหารเลี้ยงหัวเชื้อ (ภาคผนวก ก 2) บ่มไว้นาน 48 ชั่วโมง นำมาใช้เป็นหัวเชื้อสำหรับผลิตกรดมะนาวในอาหารเลี้ยงเชื้อตามภาคผนวก ก 3.5 เก็บตัวอย่างวันที่ 8-13 ของการหมัก ซึ่งเป็นระยะเวลาที่มีการผลิตกรดมะนาวสูงสุด

ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 5 และรูปที่ 12ก-12ง 13 ตามลำดับ พบว่า การเติมน้ำมันถั่วเหลือง เชื้อรามีการผลิตกรดมะนาวลดลง จึงไม่ควรมีการเติมน้ำมันพืชลงในอาหารเลี้ยงเชื้อในการผลิตกรดมะนาว เนื่องจากไม่มีผลต่อการเพิ่มผลผลิตกรดมะนาว นอกจากนี้ยังลำบากในการกรองน้ำหมัก ซึ่งทำค่อนข้างยุ่งยากและช้ากว่าเมื่อไม่มีการเติมน้ำมันพืช

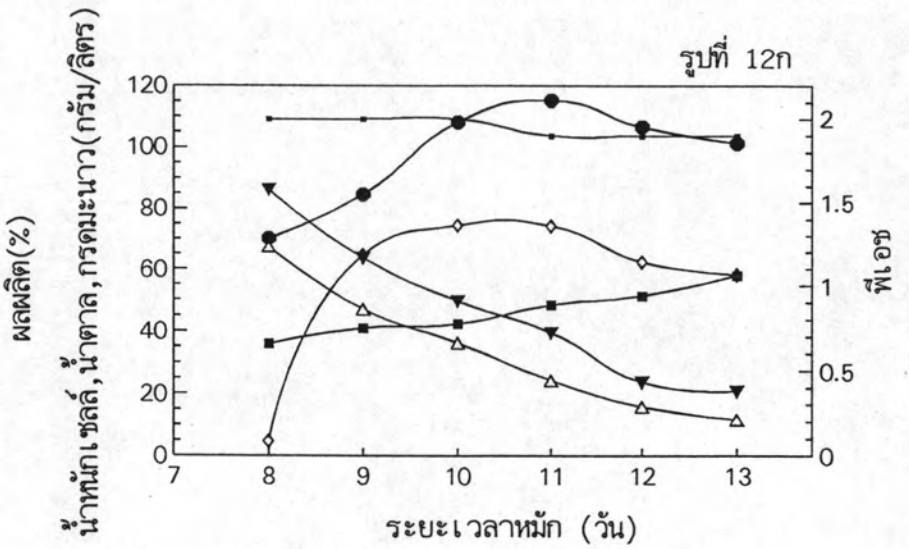
ตารางที่ 5 ผลของการแปรผันปริมาณน้ำมันถั่วเหลืองที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาว โดยเชื้อรา A. niger A185 ในระดับขวดเขย่า

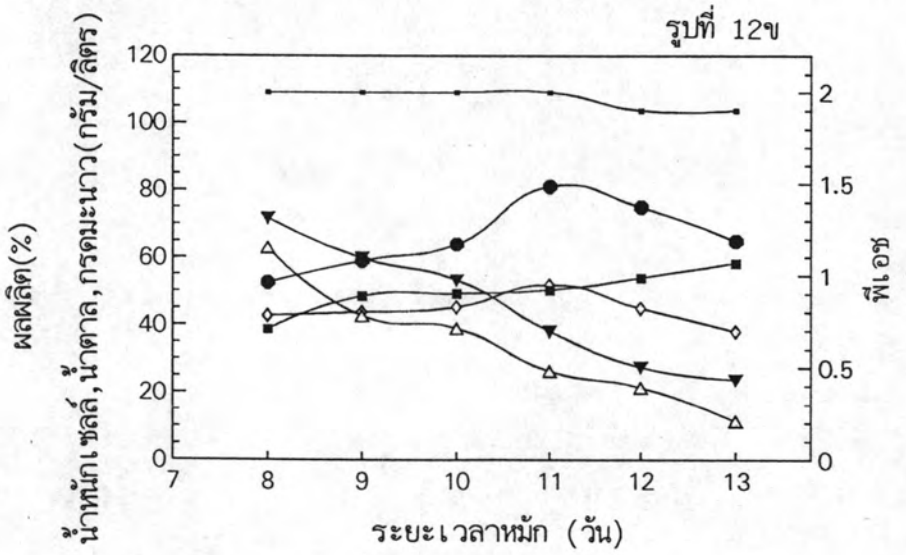
น้ำมันถั่วเหลือง (%)	เวลา (วัน)*	พีเอช	น้ำหนักเซลล์ (กรัม/ลิตร)	น้ำตาลทั้งหมด (กรัม/ลิตร)	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัม/ลิตร)	กรดมะนาว (กรัม/ลิตร)	ผลผลิต (%)
0	11	1.9	24.1	39.4	24.1	115.2	74.2
1	11	2.0	25.1	38.0	26.2	81.0	51.7
2	10	2.0	24.0	50.0	45.3	100.5	69.4
3	11	1.9	23.0	50.4	45.1	76.5	53.9

* หมายถึง ระยะเวลาที่ผลิตกรดมะนาวได้สูงสุด

1.5 ผลของการเติมสารแอลกอฮอล์โมเลกุลต่ำที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาว โดยเชื้อรา A. niger A185 ในระดับขวดเขย่า

Moyer (1953) รายงานการเติมแอลกอฮอล์โมเลกุลต่ำในการผลิตกรดมะนาวว่า มีผลในการต่อต้านสารโลหะหนักที่ปนเปื้อนในสารวัตถุดิบแหล่งคาร์บอน โดยใช้เมทิลแอลกอฮอล์ เอทิลแอลกอฮอล์ นอร์มัลโพรพานอล ไอโซโพรพิลแอลกอฮอล์ และเมทิลอะซิเทตที่ความเข้มข้น 1-5 เปอร์เซนต์ (ปริมาตรโดยปริมาตร) พบว่า การเติมเมทิลแอลกอฮอล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อให้ได้ความเข้มข้น 3 เปอร์เซนต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) เชื้อราสามารถผลิตกรดมะนาวได้สูงสุด 63.0 กรัม เช่นเดียวกับรายงานของ Purohit และ Daginawala (1986) และนิมล กิจขันธ์ (2532) นอกจากนั้น Marison (1988) ยังสรุปในรายละเอียดว่า การเติมเมทิลแอลกอฮอล์ มีผลในการเพิ่มผลผลิตกรดมะนาว การเพิ่มความทนของเชื้อราที่มีต่อไอออนของเหล็ก สังกะสี และแมงกานีส และการเพิ่มความสามารถในการผ่านสารเข้าและออกจากเส้นใย ทำให้ปล่อยกรดมะนาวออกมาได้มากขึ้น ดังนั้นในงานวิจัยนี้ จึงทำการทดลองแปรผันการเติมเมทิลแอลกอฮอล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อให้ได้ความเข้มข้น 2-4 เปอร์เซนต์ (ปริมาตรโดยปริมาตร)





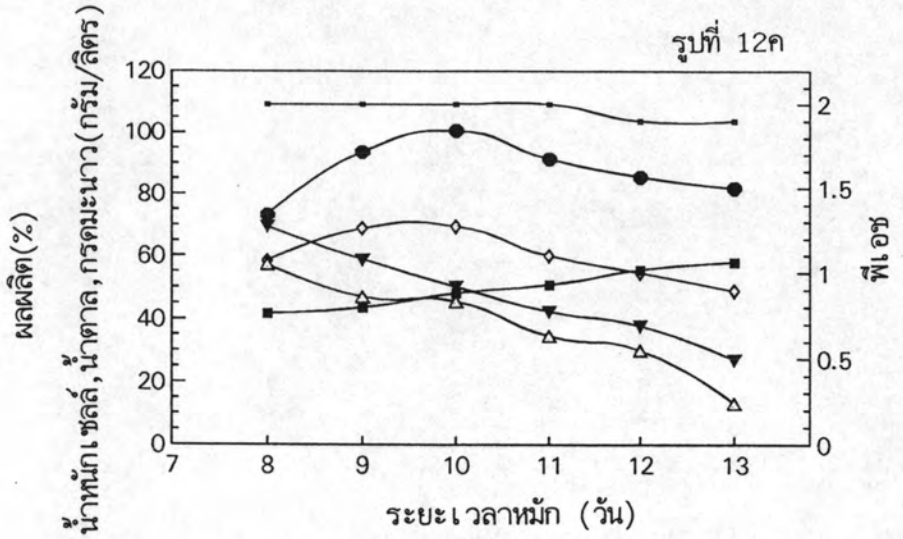
รูปที่ 12 ผลของการแปรผันปริมาณน้ำมันถั่วเหลืองที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาว โดยเชื้อรา A. niger A185 ในระดับขวดเขย่า

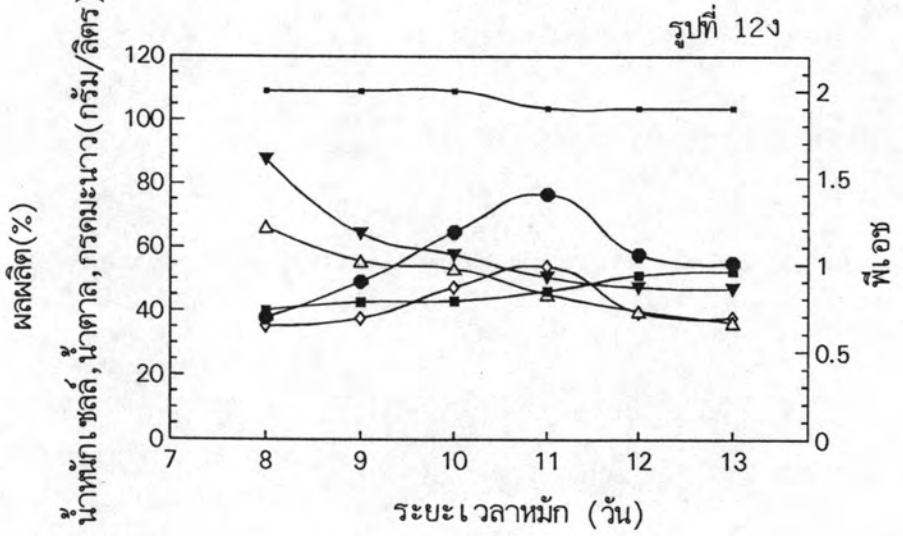
ก) น้ำมันถั่วเหลือง 0 เปอร์เซนต์ (ชุดควบคุม)

ข) น้ำมันถั่วเหลือง 1 เปอร์เซนต์

โดยที่

- น้ำหนักเซลล์แห้ง
- น้ำตาลทั้งหมด
- น้ำตาลรีดิวซ์
- กรดมะนาว
- ผลผลิต
- พีเอช





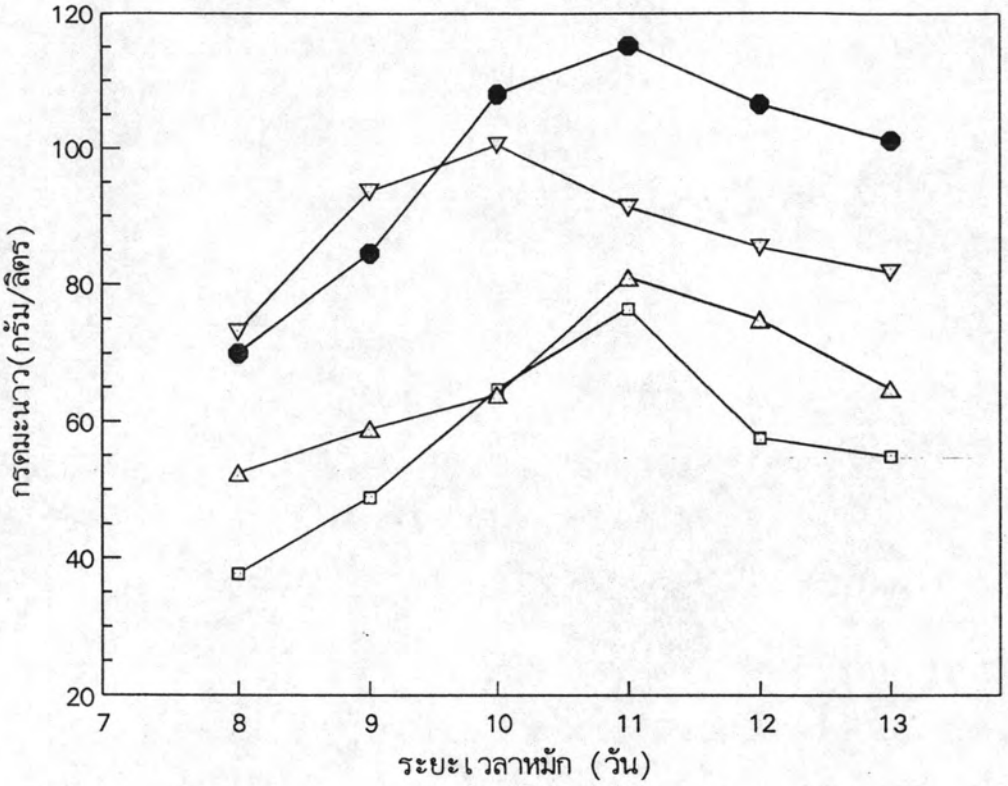
รูปที่ 12 (ต่อ) ผลของการแปรผันปริมาณน้ำมันถั่วเหลืองที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาว โดยเชื้อรา A. niger A185 ในระดับขวดเขย่า

ค) น้ำมันถั่วเหลือง 2 เปอร์เซนต์

ง) น้ำมันถั่วเหลือง 3 เปอร์เซนต์

โดยที่

- น้ำหนักเซลล์แห้ง
- ผลผลิต
- น้ำตาลทั้งหมด
- พีเอช
- น้ำตาลรีดิวซ์
- กรดมะนาว



รูปที่ 13 เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาวที่เกิดขึ้นในการแปรผันปริมาณน้ำมันถั่วเหลืองที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อรา A. niger A185 ในระดับขวดเขย่า

โดยที่

- น้ำมันถั่วเหลือง 0 เปอร์เซนต์ (ชุดควบคุม)
- น้ำมันถั่วเหลือง 1 เปอร์เซนต์
- น้ำมันถั่วเหลือง 2 เปอร์เซนต์
- น้ำมันถั่วเหลือง 3 เปอร์เซนต์

เลี้ยงเชื้อรา A. niger A185 ในอาหารเลี้ยงหัวเชื้อ (ภาคผนวก ก 2) บ่มไว้นาน 48 ชั่วโมง นำมาใช้เป็นหัวเชื้อสำหรับผลิตกรดมะนาวในอาหารเลี้ยงเชื้อตามภาคผนวก ก 3.6 เก็บตัวอย่างวันที่ 8-13 ของการหมัก ซึ่งเป็นระยะเวลาที่มีการผลิตกรดมะนาวสูงสุด

ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 6 และรูปที่ 14ก-14ง 15 ตามลำดับ พบว่า การเติมเมทิลแอลกอฮอล์มีผลต่อการเพิ่มผลผลิตกรดมะนาว จะเห็นว่า เมื่อมีการเติมเมทิลแอลกอฮอล์ 3 เปอร์เซนต์ เชื้อราสามารถเพิ่มการผลิตกรดมะนาวได้สูงสุด 127.8 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 10 ของการหมัก คิดเป็น 83.2 เปอร์เซนต์เทียบกับปริมาณน้ำตาลที่ใช้ทั้งหมด โดยชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมเมทิลแอลกอฮอล์ เชื้อราผลิตกรดมะนาวได้ 113.4 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 10 ของการหมัก คิดเป็น 76.2 เปอร์เซนต์ เทียบกับปริมาณน้ำตาลที่ใช้ทั้งหมด ส่วนการเติมเมทิลแอลกอฮอล์ 2 และ 4 เปอร์เซนต์ เชื้อราผลิตกรดมะนาวได้ 103.2 และ 82.8 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นว่า การเติมเมทิลแอลกอฮอล์ 4 เปอร์เซนต์ จะมีผลลบต่อการผลิตกรดมะนาวมาก โดยเชื้อราจะผลิตกรดมะนาวได้ต่ำมาก เมื่อพิจารณาค่าความเป็นกรดด่าง พบว่า ไม่มีความแตกต่างกันในทุกการทดลอง เมื่อพิจารณาน้ำหนักเซลล์แห้ง พบว่า การเติมเมทิลแอลกอฮอล์ทำให้เชื้อรามีการเจริญต่ำกว่าชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมเมทิลแอลกอฮอล์ เมื่อพิจารณาน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ และน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ พบว่า เมื่อมีการเติมเมทิลแอลกอฮอล์ 2 หรือ 3 เปอร์เซนต์ เชื้อรามีการใช้น้ำตาลใกล้เคียงกับชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมสารแอลกอฮอล์ ในขณะที่เมื่อมีการเติมเมทิลแอลกอฮอล์ 4 เปอร์เซนต์ เชื้อราจะมีการใช้น้ำตาลน้อยกว่า คาดว่าเป็นผลมาจากผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา เนื่องจากการเติมเมทิลแอลกอฮอล์ที่ความเข้มข้นสูงเกิน ทำให้เชื้อรามีความเจริญต่ำ การใช้น้ำตาลจึงต่ำ และผลิตกรดมะนาวได้ต่ำเช่นกัน กล่าวโดยสรุป ควรมีการเติมเมทิลแอลกอฮอล์เข้มข้น 3 เปอร์เซนต์ (ปริมาตรโดยปริมาตร) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อในการผลิตกรดมะนาว ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของผู้อื่นที่รายงานไว้ นอกจากนี้จะเห็นว่า เมื่อมีการเติมแอลกอฮอล์ จะสามารถกรองน้ำหมักได้ง่าย และรวดเร็วกว่าชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมแอลกอฮอล์

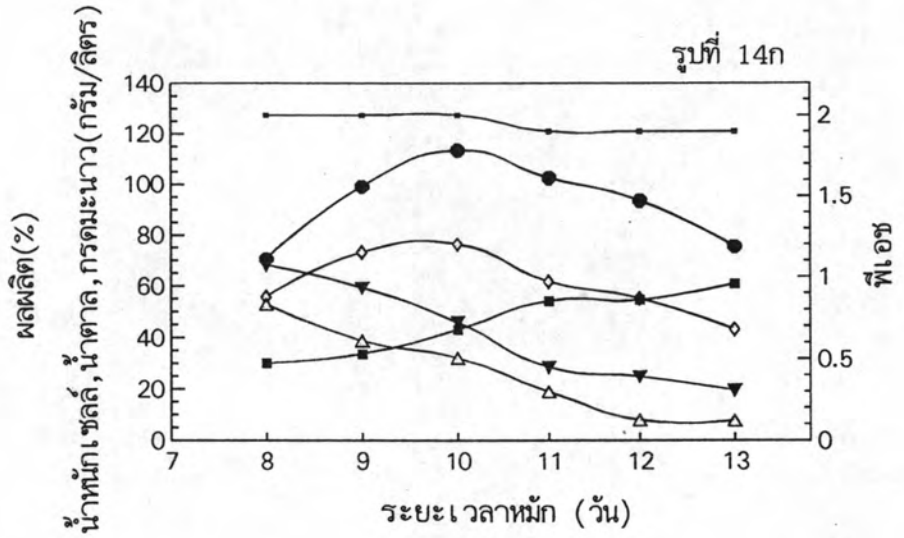
ตารางที่ 6 ผลของการแปรผันปริมาณเมทิลแอลกอฮอล์ที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาว โดยเชื้อรา A. niger A185 ในระดับขวดเขย่า

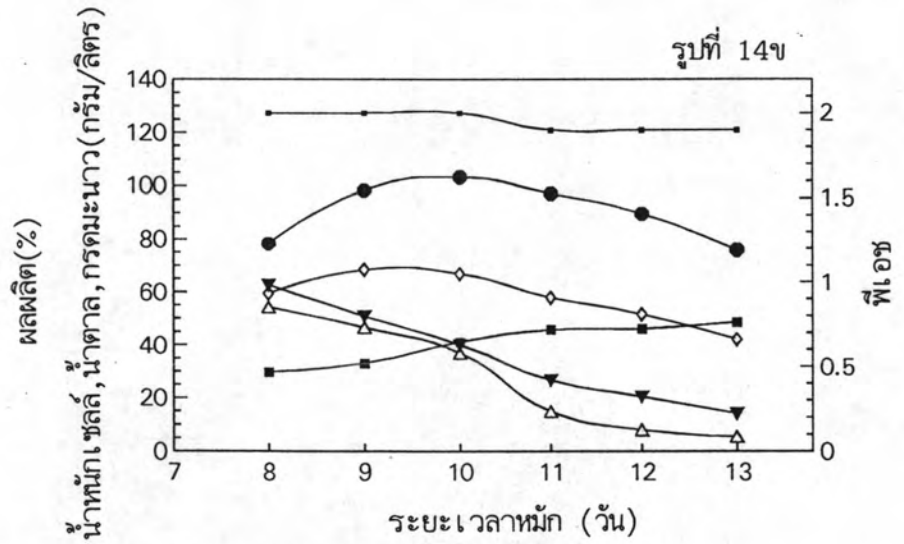
เมทิลแอลกอฮอล์ (%)	เวลา (วัน)*	พีเอช	น้ำหนักเซลล์ (กรัม/ลิตร)	น้ำตาลทั้งหมด (กรัม/ลิตร)	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัม/ลิตร)	กรดมะนาว (กรัม/ลิตร)	ผลผลิต (%)
0	10	2.0	21.5	45.8	31.9	113.4	76.2
2	10	2.0	20.5	39.9	36.8	103.2	66.7
3	10	2.0	17.7	41.2	31.0	127.8	83.2
4	13	1.9	22.4	53.2	22.0	82.5	58.5

1.6 สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อรา A. niger A185 ในระดับขวดเขย่า

เลี้ยงเชื้อรา A. niger A185 ในอาหารเลี้ยงหัวเชื้อ (ภาคผนวก ก 2) บ่มไว้นาน 48 ชั่วโมง นำมาใช้เป็นหัวเชื้อสำหรับผลิตกรดมะนาวในอาหารเลี้ยงเชื้อตามภาคผนวก ก 3.7 โดยควบคุมสภาวะการเลี้ยงเชื้อในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบการเขย่า 250 รอบต่อนาที

ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 7 และรูปที่ 16 พบว่า เชื้อราสามารถผลิตกรดมะนาวได้สูง 125.6 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 240 ของการหมัก คิดเป็น 78.8 เปอร์เซนต์ เทียบกับปริมาณน้ำตาลที่ใช้ทั้งหมด





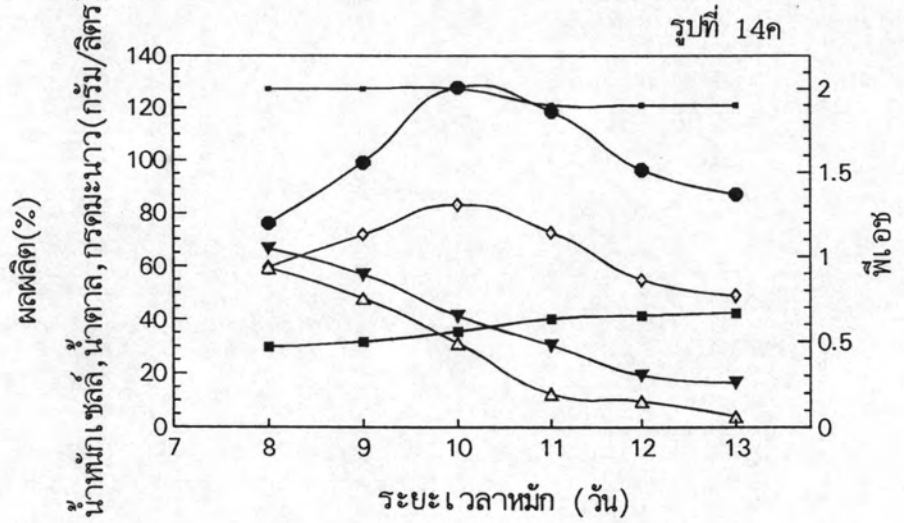
รูปที่ 14 ผลของการแปรผันปริมาณเมทิลแอลกอฮอล์ที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาว โดยเชื้อรา A. niger A185 ในระดับขวดเขย่า

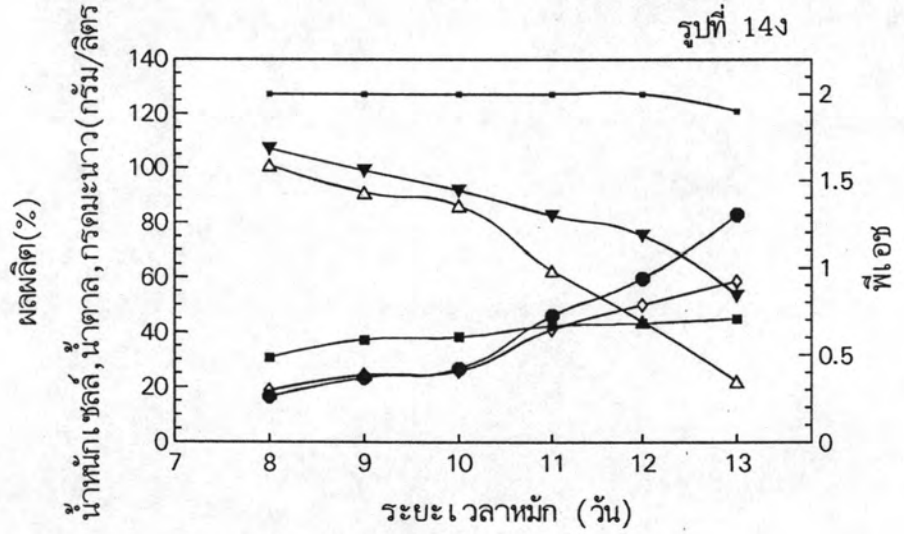
ก) เมทิลแอลกอฮอล์ 0 เปอร์เซนต์ (ชุดควบคุม)

ค) เมทิลแอลกอฮอล์ 2 เปอร์เซนต์

โดยที่

- น้ำหนักเซลล์แห้ง
- ผลผลิต
- น้ำตาลทั้งหมด
- พีเอช
- น้ำตาลรีดิวซ์
- กรดมะนาว





รูปที่ 14 (ต่อ) ผลของการแปรผันปริมาณเมทิลแอลกอฮอล์ที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาว โดยเชื้อรา A. niger A185 ในระดับขวดเขย่า

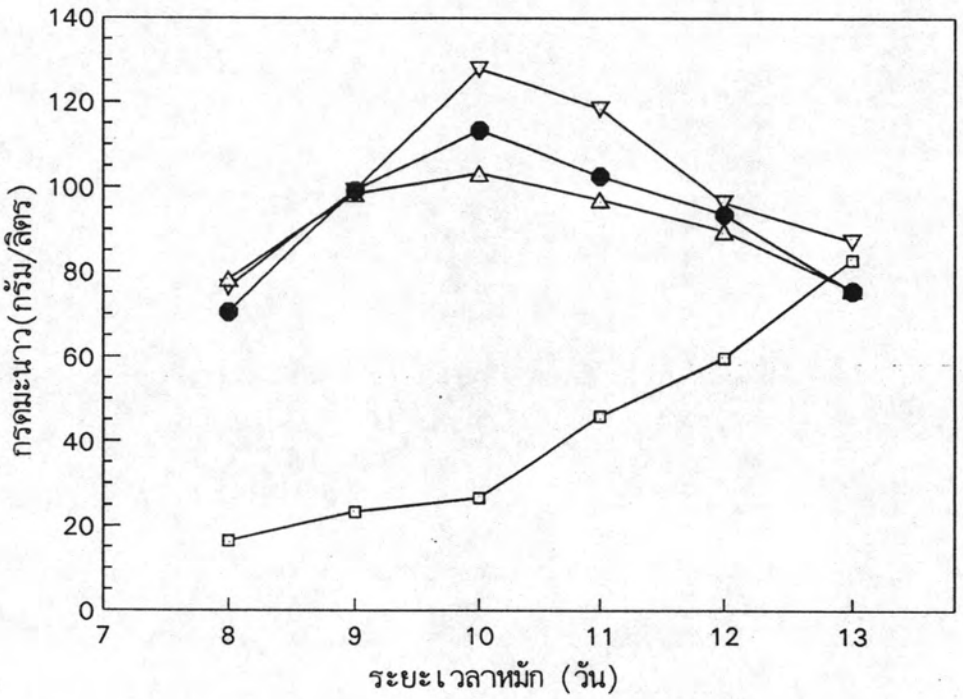
ง) เมทิลแอลกอฮอล์ 3 เปอร์เซนต์

จ) เมทิลแอลกอฮอล์ 4 เปอร์เซนต์

โดยที่

- น้ำหนักเซลล์แห้ง
- น้ำตาลทั้งหมด
- น้ำตาลรีดิวซ์
- กรดมะนาว
- ผลผลิต
- พีเอช

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 15 เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาวที่เกิดขึ้นในการแปรผันปริมาณเมทิลแอลกอฮอล์ที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาว โดยเชื้อรา A. niger A185 ในระดับขวดเขย่า

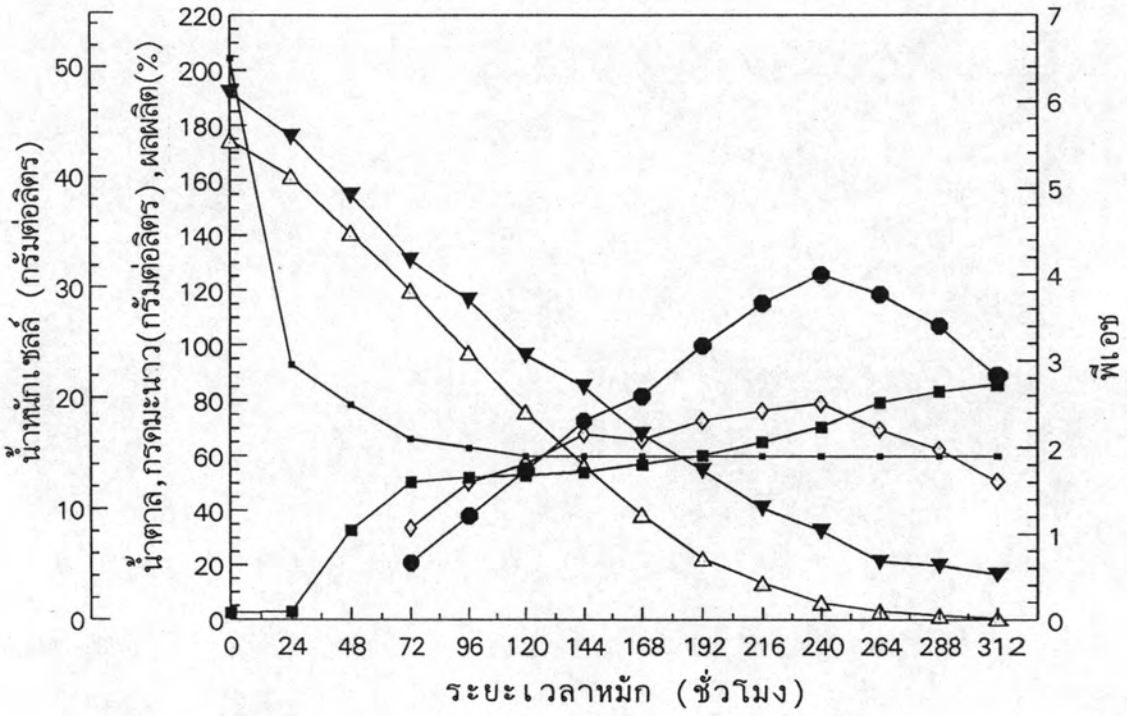
โดยที่

- เมทิลแอลกอฮอล์ 0 เปอร์เซนต์ (ชุดควบคุม)
- เมทิลแอลกอฮอล์ 2 เปอร์เซนต์
- เมทิลแอลกอฮอล์ 3 เปอร์เซนต์
- เมทิลแอลกอฮอล์ 4 เปอร์เซนต์

ตารางที่ 7 ผลของการเลี้ยงเชื้อรา A. niger A185 โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะที่เหมาะสมสำหรับผลิตกรดมะนาว ในระดับขวดเขย่า

เวลา (ชั่วโมง)	พีเอช	น้ำหนักเซลล์ (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)	กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	ผลผลิต (%)
0	6.5	0.6	174.3	191.9	-	-
24	3.0	0.7	161.4	175.7	-	-
48	2.5	8.2	140.8	154.6	-	-
72	2.1	12.6	119.7	130.9	20.8	33.6
96	2.0	13.0	97.1	116.2	38.0	50.2
120	1.9	13.2	75.8	96.2	54.4	56.8
144	1.9	13.5	56.4	84.8	72.5	67.7
168	1.9	14.2	38.5	67.8	81.5	65.7
192	1.9	15.0	22.4	54.6	99.7	72.6
216	1.9	16.2	13.3	40.9	115.1	76.2
240	1.9	17.6	6.1	32.6	125.6	78.8
264	1.9	19.8	3.0	21.2	118.4	69.4
288	1.9	20.8	1.5	19.8	106.9	62.1
312	1.9	21.4	0.4	16.5	88.8	50.6

- หมายถึง ไม่ได้ทำการวิเคราะห์



รูปที่ 16 การผลิตกรดมะนาวในสภาวะที่เหมาะสมโดยเชื้อรา A. niger A185 ในระดับขวดเขย่า

โดยที่

- น้ำหนักเซลล์แห้ง
- น้ำตาลทั้งหมด
- น้ำตาลรีดิวซ์
- กรดมะนาว
- ผลผลิต
- พีเอช

2. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อรา A. niger A185 ในระดับถังหมัก 5 ลิตร

จากผลการทดลองข้อ 1. สามารถหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อรา A. niger A185 ในระดับขวดเขย่า จึงนำสภาวะดังกล่าวมาใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการขยายส่วนเป็นระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อเช่นเดียวกับการผลิตในระดับขวดเขย่า (ภาคผนวก ก 3.7) แล้วทำการศึกษาปัจจัยต่างๆที่มีผลต่อการผลิตกรดมะนาวที่ไม่สามารถทดลองในระดับขวดเขย่าได้คือ ปริมาณออกซิเจนที่ละลาย ซึ่งสามารถศึกษาในรูปของอัตราการกวนและอัตราการให้อากาศ อีกปัจจัยที่นิยมศึกษากันคือ การเติมสารในระหว่างการหมัก ซึ่งเป็นกระบวนการหมักแบบ fed-batch culture

2.1 ผลของอัตราการกวนที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อรา A. niger A185

อัตราการกวนและอัตราการให้อากาศขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของเชื้อ ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ และขนาดของถังหมัก โดยส่วนใหญ่มักมีการควบคุมอัตราการให้อากาศและมีการแปรผันอัตราการกวน ซึ่งมีผลต่อการละลายของออกซิเจนมากกว่าอัตราการให้อากาศ

นิมล กิจขันธ์ (2532) รายงานว่า การผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อรา A. niger โดยใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นสารแหล่งคาร์บอน ใช้ถังหมักขนาด 2.5 ลิตร ปริมาตรขณะใช้งาน 1.7 ลิตร ควบคุมอัตราการให้อากาศเป็น 1.0 v.v.m. และแปรผันอัตราการกวน 600 700 800 และ 1000 รอบต่อนาที พบว่า เมื่อใช้อัตราการกวน 700 รอบต่อนาที เชื้อราสามารถผลิตกรดมะนาวได้สูงสุด 14.8 เปอร์เซนต์ ในวันที่ 10 ของการหมัก โดยใช้วิธีไพริดินอะซิติคแอนไฮไดรด์ ในการวิเคราะห์ปริมาณกรดมะนาว และเมื่อใช้ถังหมักขนาด 14 ลิตร ปริมาตรเริ่มต้น 10 ลิตร ควบคุมอัตราการให้อากาศเป็น 0.8 v.v.m. และแปรผันอัตราการกวน 600 650 และ 700 รอบต่อนาที พบว่า เมื่อใช้อัตราการกวนผสม 700 รอบต่อนาที เชื้อราสามารถผลิตกรดมะนาว 14.2 เปอร์เซนต์ ในวันที่ 10 ของการหมัก สำหรับในงานวิจัยนี้ จะทดลองแปรผันอัตราการกวนในช่วง 300-600 รอบต่อนาที

เลี้ยงเชื้อรา A. niger A185 ในอาหารเลี้ยงหัวเชื้อ (ภาคผนวก ก 2) บ่มไว้นาน 48 ชั่วโมง นำมาใช้เป็นหัวเชื้อสำหรับผลิตกรดมะนาว ในอาหารเลี้ยงเชื้อตามภาคผนวก ก 4 ใช้ถังหมักขนาด 5 ลิตร ปริมาตรเริ่มต้น 3.5 ลิตร ควบคุมอัตราการให้อากาศ 1.0 v.v.m. ทำการแปรผันอัตราการกวนที่ 300 400 500 และ 600 รอบต่อนาที ตามลำดับ เก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง

ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 8ก–8ง และ รูปที่ 17ก–17ง และ 18 ตามลำดับ จะเห็นว่า อัตราการกวนมีผลต่อการเพิ่มผลผลิตกรดมะนาว ซึ่งพบว่า เมื่อใช้อัตราการกวน 500 รอบต่อนาที เชื้อราสามารถผลิตกรดมะนาวได้สูงสุด 115.3 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 204 ของการหมัก ในขณะที่เมื่อใช้อัตราการกวนเป็น 600 400 และ 300 รอบต่อนาที เชื้อราจะผลิตกรดมะนาวได้เพียง 112.7 102.8 และ 92.5 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ชี้ให้เห็นว่า เชื้อราต้องการออกซิเจนอย่างสูงเพียงพอสำหรับการผลิตกรดมะนาว เมื่อพิจารณาค่าความเป็นกรดด่าง พบว่า ค่าความเป็นกรดด่างในถังหมักลดต่ำลงมากใน 12 ชั่วโมงแรกของการหมัก และค่อยๆลดลงอย่างต่อเนื่อง จนกระทั่งมีค่าความเป็นกรดด่างคงที่ที่ 1.9–2.0 และไม่มีความแตกต่างกันในทุกการทดลอง เมื่อพิจารณาน้ำหนักเซลล์แห้ง พบว่า ในระยะ 12 ชั่วโมงแรกของการหมัก เชื้อรามีการเจริญต่ำ โดยมีการเพิ่มน้ำหนักเซลล์เล็กน้อย ต่อมาเชื้อรามีการเจริญสูงขึ้น โดยมีการเพิ่มน้ำหนักเซลล์มากขึ้น ซึ่งจะเห็นว่า การเพิ่มอัตราการกวนมีผลทำให้เชื้อราเจริญได้ดีขึ้น โดยเมื่อใช้อัตราการกวนผสมต่ำ 300 รอบต่อนาที เชื้อราจะเจริญได้น้อย ทั้งนี้คาดว่า เนื่องจากการจำกัดของปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมัก เมื่อพิจารณาน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือและน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ พบว่า การเพิ่มอัตราการกวน เชื้อราสามารถใช้น้ำตาลได้มากและเร็วขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับผลการเจริญของเชื้อรา เมื่อใช้อัตราการกวนผสมสูง เชื้อรามีการใช้น้ำตาลอย่างต่อเนื่อง จนเกือบใช้หมดในระหว่างชั่วโมงที่ 216–240 ในขณะที่ใช้อัตราการกวนต่ำ 300 รอบต่อนาที ซึ่งเชื้อราเจริญได้น้อย มีการใช้น้ำตาลน้อย ทำให้มีน้ำตาลเหลืออยู่มาก ดังนั้นในการทดลองต่อไปในถังหมักขนาด 5 ลิตร จึงใช้เลือกใช้อัตราการกวน 500 รอบต่อนาที

ตารางที่ 8ก ผลของการแปรผันอัตราการกวนที่ 300 รอบต่อนาที ในการผลิตกรดมะนาว โดยเชื้อรา A. niger A185 ในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร

เวลา (ชั่วโมง)	พีเอช	น้ำหนักเซลล์ (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)	กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)
0	6.5	0.6	176.2	192.6	-
12	3.0	0.7	166.6	187.5	-
24	2.3	4.2	160.7	180.0	-
36	2.0	5.9	159.7	174.3	-
48	2.0	8.4	147.0	172.7	-
60	2.0	10.1	141.1	163.2	-
72	2.0	11.9	130.3	159.5	3.7
84	2.0	12.1	129.4	148.3	6.2
96	2.0	12.3	121.2	143.7	8.7
108	2.0	13.7	118.6	129.2	10.3
120	2.0	14.9	107.2	120.0	13.6
132	2.0	15.4	96.7	118.7	17.5
144	2.0	15.8	88.9	108.2	24.2
156	2.0	16.0	87.6	101.8	37.5
168	2.0	17.2	82.4	96.5	46.1
180	2.0	17.6	78.4	94.2	58.0
192	2.0	18.0	74.1	89.1	62.7
204	2.0	19.1	69.0	87.3	79.4
216	2.0	19.3	66.7	86.8	84.7
228	2.0	20.2	54.2	78.9	92.5
240	2.0	20.7	48.7	77.4	91.2
252	2.0	20.9	41.2	72.5	86.3
264	2.0	21.2	35.8	67.3	81.2

ตารางที่ 8ข ผลของการแปรผันอัตราการกวนที่ 400 รอบต่อนาที ในการผลิตกรดมะนาว โดยเชื้อรา A. niger A185 ในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร

เวลา (ชั่วโมง)	พีเอช	น้ำหนักเซลล์ (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)	กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)
0	6.4	0.6	178.7	195.7	-
12	3.0	0.7	158.9	182.1	-
24	2.6	4.7	141.2	175.3	-
36	2.2	6.2	133.3	163.8	-
48	2.2	9.2	121.5	156.4	-
60	2.2	10.7	117.6	149.7	-
72	2.2	12.7	112.9	138.4	24.5
96	2.0	13.6	106.1	124.8	39.8
120	2.0	16.1	77.4	98.4	56.2
144	1.9	17.7	49.0	71.4	76.2
168	1.9	22.3	44.8	58.3	82.5
192	1.9	26.2	26.6	29.8	82.6
216	1.9	29.7	17.6	22.6	97.6
240	1.9	31.8	9.6	17.3	102.8
264	1.9	33.6	7.4	16.1	83.5
288	1.9	35.0	6.1	15.8	79.8

- หมายถึง ไม่ได้ทำการวิเคราะห์

ตารางที่ 8ค ผลของการแปรผันอัตราการกวนที่ 500 รอบต่อนาที ในการผลิตกรดมะนาว โดยเชื้อรา A. niger A185 ในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร

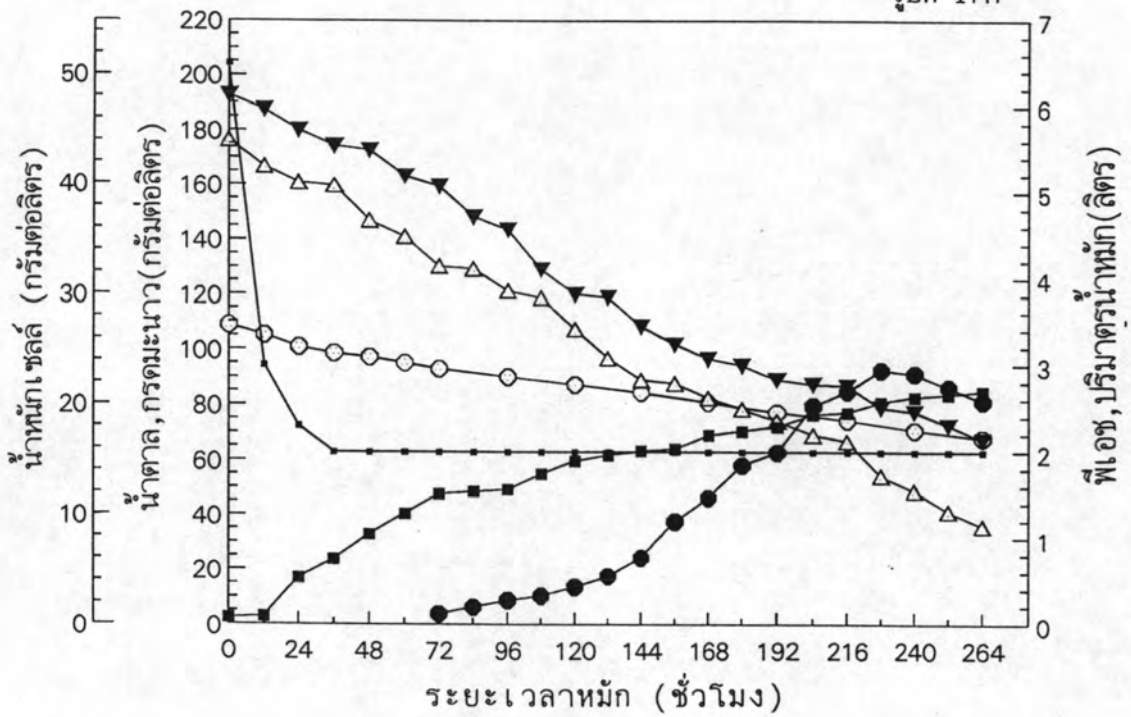
เวลา (ชม)	พีเอช	น้ำหนักเซลล์ (กรัม/ลิตร)	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัม/ลิตร)	น้ำตาลทั้งหมด (กรัม/ลิตร)	กรดมะนาว (กรัม/ลิตร)
0	6.4	0.6	178.2	198.8	0.6
12	3.0	0.7	152.4	173.4	3.0
24	2.8	4.7	134.6	159.2	5.8
36	2.6	6.7	122.8	143.5	8.5
48	2.0	9.5	112.8	134.6	14.6
60	2.0	11.7	104.8	120.8	24.6
72	2.0	13.8	96.0	110.8	44.9
84	2.0	14.6	90.2	103.2	56.3
96	2.0	15.4	83.6	95.8	60.5
108	2.0	16.3	75.6	88.6	71.9
120	1.9	17.5	64.7	81.2	76.9
132	1.9	18.7	53.5	68.3	87.2
144	1.9	19.4	41.3	54.2	92.5
156	1.9	22.5	34.4	47.5	99.6
168	1.8	26.1	22.9	32.0	100.3
180	1.8	28.6	17.9	26.4	106.8
192	1.8	31.1	9.3	19.7	108.8
204	1.8	32.4	5.6	16.5	115.3
216	1.8	33.2	2.8	13.3	112.1
228	1.8	34.9	2.8	12.4	108.4
240	1.8	36.1	2.8	12.4	98.5
252	1.8	37.4	2.8	12.4	95.2
264	1.8	38.6	2.0	11.8	83.6

ตารางที่ 8ง ผลของการแปรผันอัตราการกวนที่ 600 รอบต่อนาที ในการผลิตกรดมะนาว โดยเชื้อรา A. niger A185 ในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร

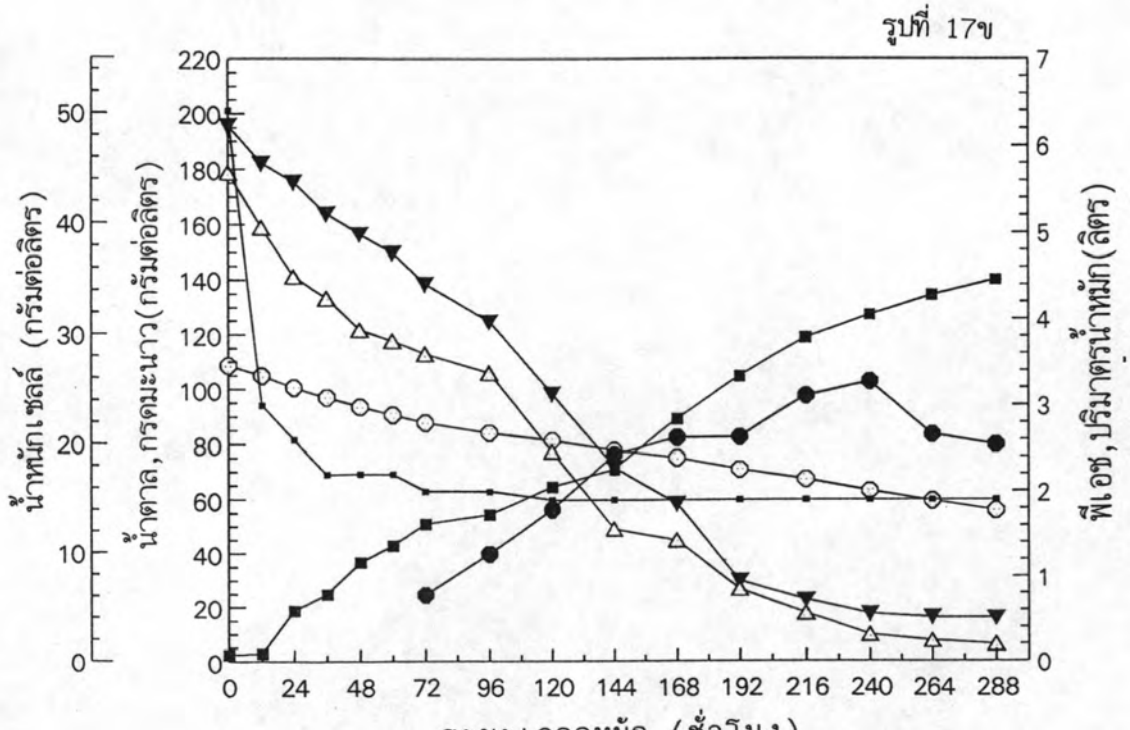
เวลา (ชั่วโมง)	พีเอช	น้ำหนักเซลล์ (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)	กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)
0	6.4	0.6	177.8	195.3	-
12	3.0	1.6	149.8	169.2	-
24	2.5	5.7	129.0	152.3	6.5
36	2.1	8.4	121.4	132.5	9.8
48	2.1	9.9	112.5	127.6	13.3
60	2.0	11.1	108.4	115.4	22.7
72	2.0	13.8	95.8	103.8	49.9
96	2.0	16.4	86.7	96.0	73.4
120	2.0	19.2	47.6	63.6	86.2
144	1.9	23.8	28.5	47.7	96.1
168	1.9	28.8	21.8	34.8	102.5
192	1.9	32.9	9.6	19.8	108.5
216	1.9	36.2	2.0	12.6	112.7
240	1.9	36.8	2.0	12.0	104.1

- หมายถึง ไม่ได้ทำการวิเคราะห์

รูปที่ 17ก



รูปที่ 17ข



รูปที่ 17 ผลของการแปรผันอัตราการกวนที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อรา A. niger A185 ในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร

ก) อัตราการกวน 300 รอบต่อนาที

ข) อัตราการกวน 400 รอบต่อนาที

โดยที่

- น้ำหนักเซลล์แห้ง
- น้ำตาลทั้งหมด
- น้ำตาลรีดิวซ์
- กรดมะนาว
- พีเอช
- ปริมาตรน้ำหมัก

รูปที่ 17 (ต่อ) ผลของการแปรผันอัตราการกวนที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาว
โดยเชื้อรา A. niger A185 ในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร

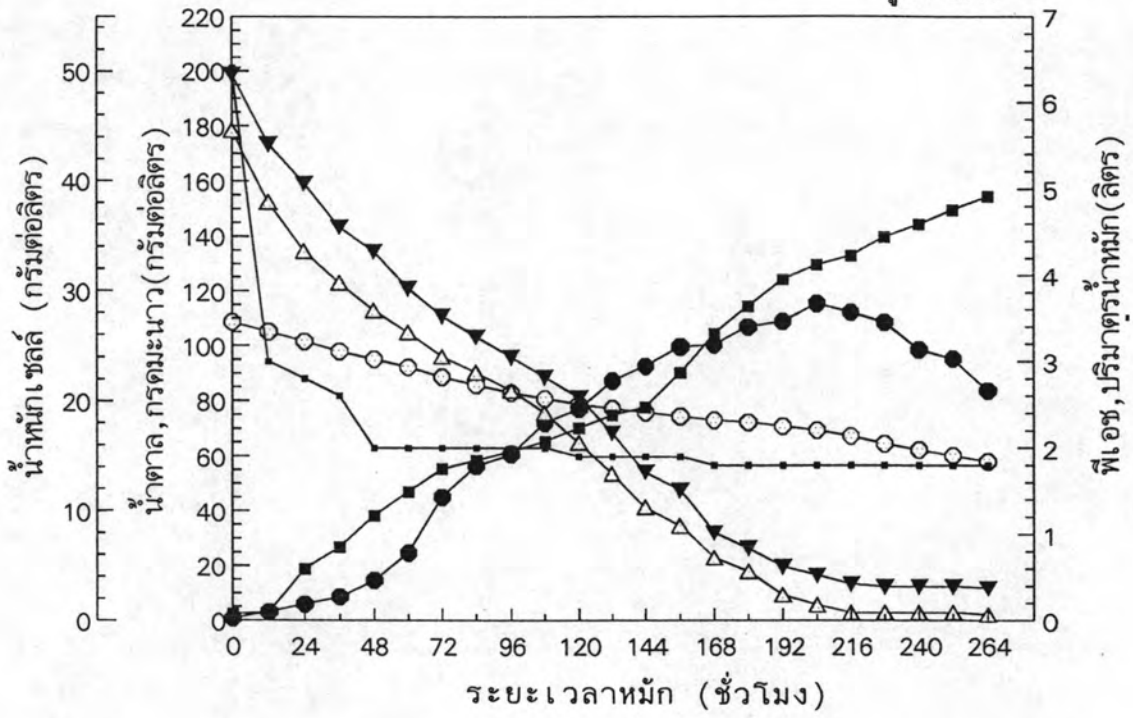
ค) อัตราการกวน 500 รอบต่อนาที

ง) อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที

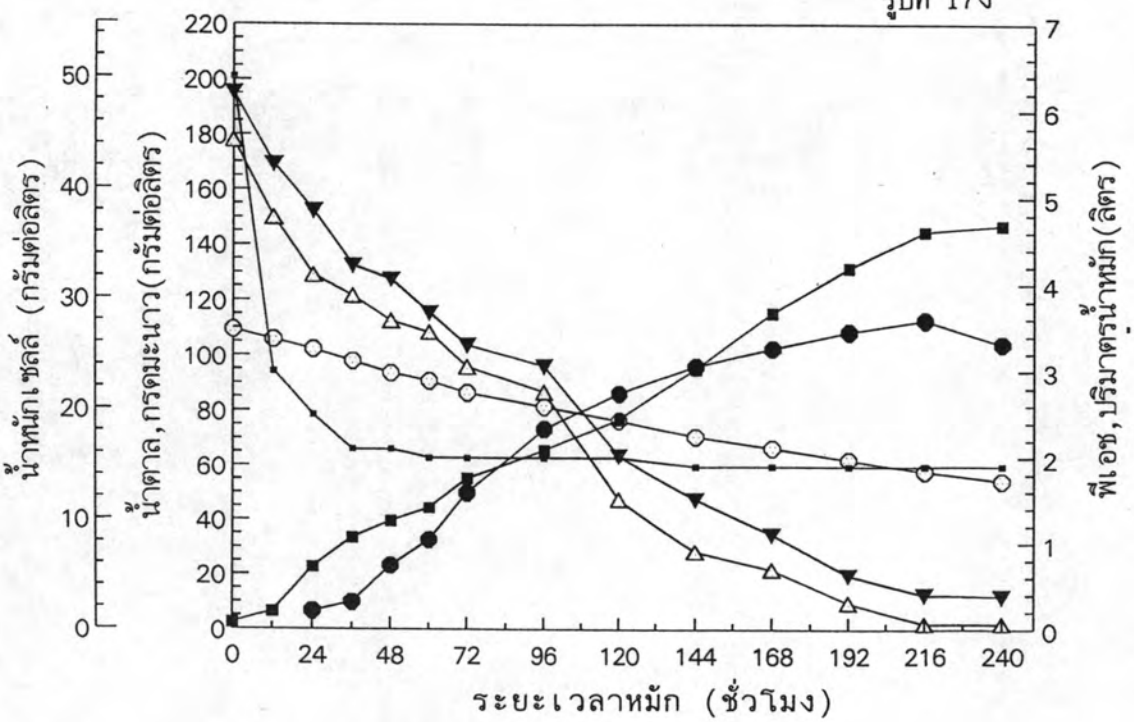
โดยที่

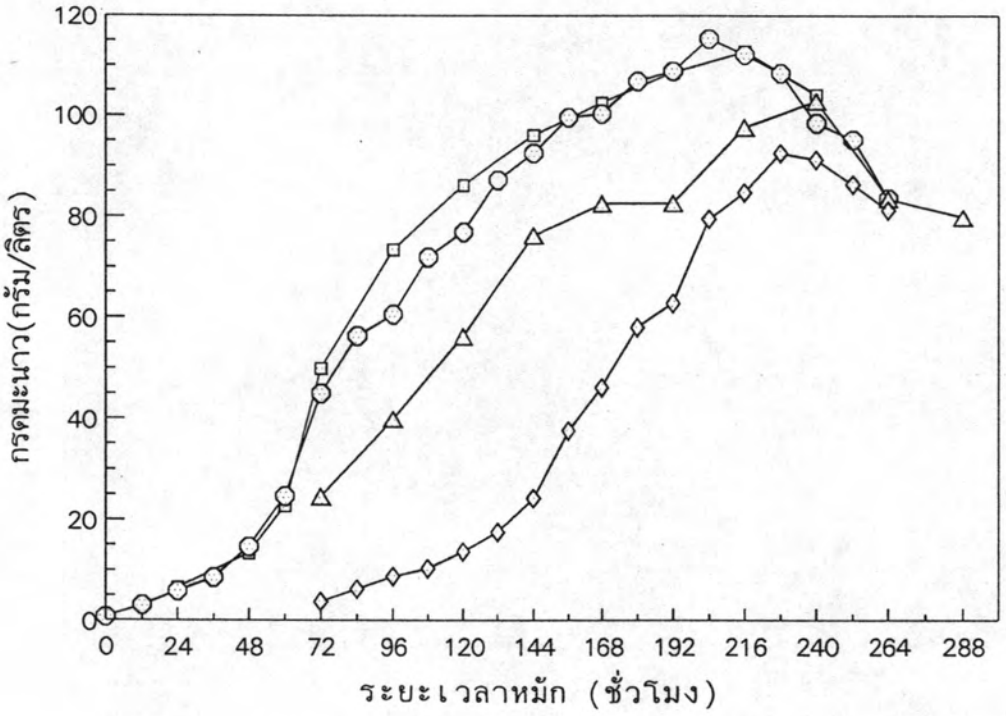
- น้ำหนักเซลล์แห้ง
- พีเอช
- น้ำตาลทั้งหมด
- ปริมาตรน้ำหมัก
- น้ำตาลรีดิวซ์
- กรดมะนาว

รูปที่ 17ค



รูปที่ 17ง





รูปที่ 18 เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาวที่เกิดขึ้นในการแปรผันอัตราการกวนที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาว โดยเชื้อรา A. niger A185 ในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร

โดยที่

-◇- อัตราการกวน 300 รอบต่อนาที

-△- อัตราการกวน 400 รอบต่อนาที

-○- อัตราการกวน 500 รอบต่อนาที

-□- อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที

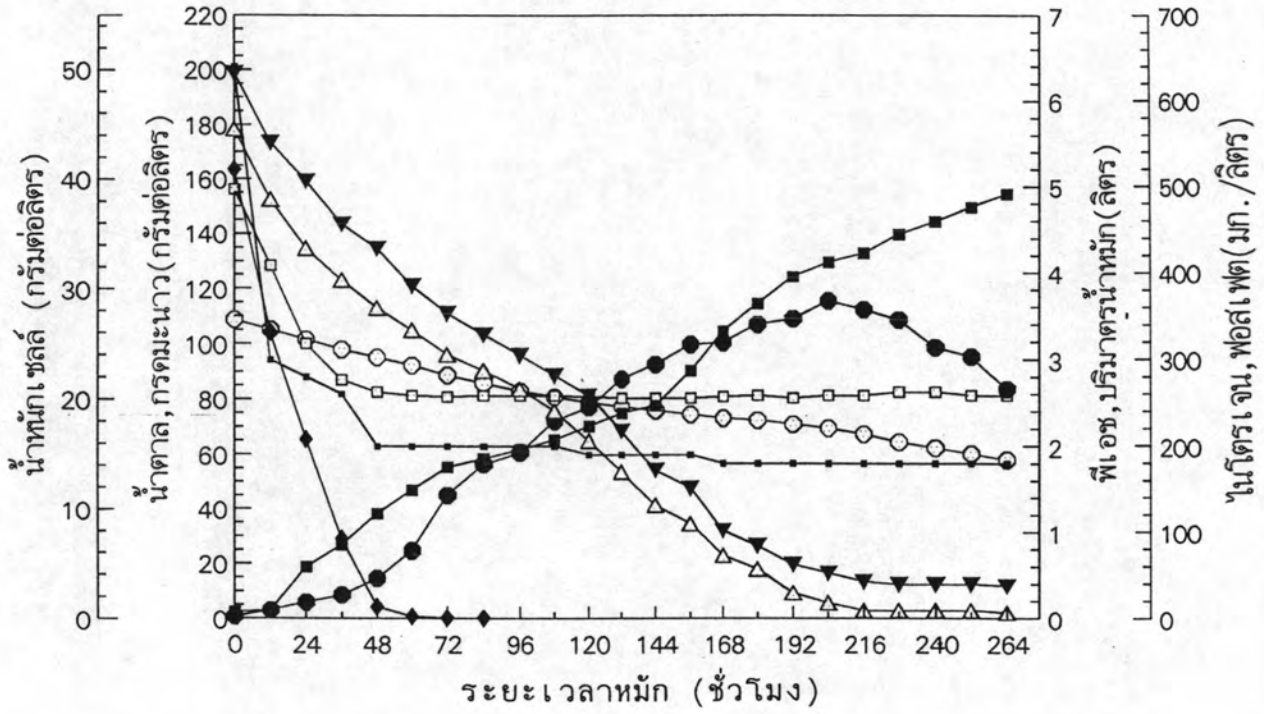
2.2 <u>สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อ A. niger A185 ในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้กระบวนการหมักแบบ batch culture</u>

เลี้ยงเชื้อรา <u>A. niger</u> A185 ในอาหารเลี้ยงหัวเชื้อ (ภาคผนวก ก 2) บ่มไว้นาน 48 ชั่วโมง นำมาใช้เป็นหัวเชื้อสำหรับผลิตกรดมะนาว ในอาหารเลี้ยงเชื้อตามภาคผนวก ก 4 ใช้ถังหมักขนาด 5 ลิตร ปริมาตรเริ่มต้น 3.5 ลิตร ควบคุมอัตราการให้อากาศ 1.0 v.v.m. และอัตราการกวน 500 รอบต่อนาที ตามลำดับ เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง

ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 19 พบว่า เชื้อราสามารถผลิตกรดมะนาวได้สูง 115.3 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 204 ของการหมัก คิดเป็นผลผลิตเท่ากับ 63.2 เปอร์เซนต์ เทียบกับน้ำตาลที่ใช้ทั้งหมด และมีปริมาตรน้ำหมักเหลือเพียง 2.204 มิลลิลิตร เมื่อพิจารณาปริมาณไนโตรเจนที่เหลือ พบว่า เชื้อรามีการใช้ไนโตรเจนอย่างรวดเร็วและใช้ไนโตรเจนหมดภายใน 60 ชั่วโมงแรกของการหมัก เมื่อพิจารณาปริมาณฟอสเฟต พบว่าเชื้อรามีการใช้ฟอสเฟตอย่างต่อเนื่อง และไม่มีการใช้ฟอสเฟตอีกต่อไป เมื่อไนโตรเจนถูกใช้หมด

2.3 <u>ผลของอัตราการเติมแป้งที่ผ่านการย่อยต่อการผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อรา A. niger A185 โดยใช้กระบวนการหมักแบบ fed-batch culture</u>

จากผลการทดลองข้อ 2.1 เมื่อใช้อัตราการกวน 500 รอบต่อนาที ปริมาณน้ำตาลที่เหลือในถังหมักต่ำมากก่อนสิ้นสุดการหมัก ดังนั้น จึงควรมีการเติมน้ำตาลในระหว่างการหมัก เพื่อให้เชื้อมีสารอาหารเพียงพอต่อการผลิตกรดมะนาวได้อย่างเต็มที่ ซึ่งเป็นกระบวนการหมักแบบ fed-batch culture โดยจะต้องหาปริมาณและความเข้มข้นของสารที่เติม ระยะเวลาในการเติมสาร และอัตราการเติมสารที่เหมาะสม สำหรับปริมาณและความเข้มข้นของสารที่เติมนั้น ในการทดลองจะใช้แป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ซึ่งมีปริมาณของแข็งทั้งหมดเป็น 383.3 กรัมต่อลิตร เป็นสารที่ใช้เติม ส่วนระยะเวลาในการเติมสาร โดยการพิจารณาจากค่าของอัตราการเกิดกรดมะนาวจำเพาะต่ออัตราการเจริญจำเพาะมีค่าสูงสุด พบว่า ควรเริ่มมีการเติมสารในชั่วโมงที่ 96 ของการหมัก (Hong, 1986) ส่วนปัญหาเกี่ยวกับอัตราการเติมสารนั้น ในงานวิจัยนี้จะทำการควบคุมอัตรา



รูปที่ 19 การผลิตกรดมะนาวในสภาวะที่เหมาะสมโดยเชื้อรา A. niger A185 ในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้กระบวนการหมักแบบ batch culture

โดยที่

- น้ำหนักเซลล์แห้ง
- น้ำตาลทั้งหมด
- น้ำตาลรีดิวซ์
- กรดมะนาว
- พีเอช
- ปริมาตรน้ำหมัก
- ไนโตรเจน
- ฟอสเฟต

การเติมให้คงที่ระดับหนึ่งก่อน เพื่อเป็นการศึกษาลักษณะการเปลี่ยนแปลงของการหมักแบบมีการเติมสาร แล้วจึงนำผลการทดลองมาวิเคราะห์ เพื่อทำการเพิ่มอัตราการเติมสารตามรายงานของ Modak และคณะ (1986) ในลำดับต่อไป

2.3.1 <u>การเติมแป้งที่ผ่านการย่อยโดยมีอัตราคงที่ตลอดการเติม</u>

เลี้ยงเชื้อรา <u>A. niger</u> A185 ในอาหารเลี้ยงหัวเชื้อ (ภาคผนวก ก 2) บ่มไว้นาน 48 ชั่วโมง นำมาใช้เป็นหัวเชื้อสำหรับผลิตกรดมะนาวในอาหารเลี้ยงเชื้อตามภาคผนวก ก 4 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ปริมาตรเริ่มต้น 3.5 ลิตร ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 500 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1.0 v.v.m. ทำการแปรผันอัตราการเติมแป้งที่ผ่านการย่อย 2 ลักษณะ คือ

2.3.1.1 การเติมแป้งที่ผ่านการย่อยอัตรา 1.92 กรัมต่อชั่วโมง หรือ 0.005 ลิตรต่อชั่วโมง เริ่มตั้งแต่ชั่วโมงที่ 96

2.3.1.2 การเติมแป้งที่ผ่านการย่อยอัตรา 2.88 กรัมต่อชั่วโมง หรือ 0.0075 ลิตรต่อชั่วโมง เริ่มตั้งแต่ชั่วโมงที่ 96

ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 9ก–9ข และรูปที่ 20ก–20ข ตามลำดับ จะเห็นว่า เมื่อพิจารณาค่าความเป็นกรดด่าง พบว่า ค่าความเป็นกรดด่างในถังหมักลดลงอย่างรวดเร็วใน 12 ชั่วโมงแรกของการหมัก และค่อยๆลดลงอย่างต่อเนื่องจนกระทั่งคงที่ที่ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 1.7–2.0 ภายในระยะเวลา 3 วัน เมื่อพิจารณาน้ำหนักเซลล์แห้ง พบว่า ในระยะ 12 ชั่วโมงแรก เชื้อรามีการเจริญเพียงเล็กน้อย โดยมีการเพิ่มน้ำหนักเซลล์ต่ำมาก ต่อมาเชื้อรามีการเจริญมากขึ้นเรื่อยๆ โดยมีการเพิ่มน้ำหนักเซลล์สูงขึ้น ซึ่งมีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงถึง 52.5 และ 31.4 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 312 ในการทดลองที่ 2.3.1.1 และ 2.3.1.2 ตามลำดับ แสดงว่า การทดลองที่ 2.3.1.1 เชื้อรามีการเจริญสูง ส่วนการทดลองที่ 2.3.1.2 เชื้อรามีการเจริญต่ำกว่า เมื่อพิจารณาน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือและน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ พบว่า เชื้อรามีการใช้น้ำตาลอย่างต่อเนื่องสอดคล้องกับผลการเจริญ เมื่อพิจารณาปริมาณกรดมะนาว พบว่า ในระยะ 48 ชั่วโมงแรกของการหมัก เชื้อรามีการผลิตกรดมะนาวเล็กน้อย ต่อมาเชื้อรามีการผลิตกรดมะนาวเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว และสามารถผลิตกรดมะนาวได้สูงสุด 117.8 และ 128.6 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 240 และ 192 ในการทดลองที่ 2.3.1.1 และ 2.3.1.2 ตามลำดับ

ตารางที่ 9ก ผลของการเติมแป้งที่ผ่านการย่อยอัตรา 1.92 กรัมต่อชั่วโมง เริ่มตั้งแต่ชั่วโมงที่ 96 ในการผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อรา A. niger A185 ในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้กระบวนการหมักแบบ fed-batch culture

เวลา (ชม.)	พีเอช	น้ำหนักเซลล์ (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)	กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)
0	6.4	0.6	173.4	197.6	
12	3.0	0.7	159.9	179.2	2.4
24	2.7	4.9	153.4	171.5	5.9
36	2.4	6.4	139.5	158.6	7.8
48	2.2	9.1	132.4	150.2	12.4
60	2.0	11.1	124.5	146.5	22.8
72	2.0	13.1	115.8	132.8	35.6
84	2.0	14.8	103.8	119.3	50.4
96	1.9	16.8	97.4	113.6	64.3
108	1.9	19.3	88.1	106.3	73.2
120	1.8	22.9	85.2	103.5	82.6
132	1.8	24.6	80.0	99.6	87.5
144	1.8	25.8	76.8	93.4	92.1
156	1.8	29.4	69.3	88.2	98.4
168	1.8	31.7	63.2	84.7	101.9
180	1.8	34.7	57.2	78.5	105.8
192	1.8	37.0	56.4	76.4	109.6
204	1.8	38.9	54.8	74.7	111.3
216	1.8	39.4	48.6	70.6	112.2

ยังมีต่อ...

ตารางที่ 9ก (ต่อ)

เวลา (ชม.)	พีเอช	น้ำหนักเซลล์ (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)	กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)
228	1.7	41.7	45.7	67.3	116.2
240	1.7	43.1	45.5	66.3	117.8
252	1.8	45.2	42.8	62.8	117.3
264	1.8	46.8	49.5	68.0	114.7
276	1.8	48.2	50.2	69.5	109.5
288	1.8	49.9	54.7	75.4	109.9
300	1.8	51.3	54.2	73.2	113.1
312	1.8	52.5	59.3	78.7	110.2

ตารางที่ 9ข ผลของการเติมแป้งที่ผ่านการย่อยอัตรา 2.88 กรัมต่อชั่วโมง เริ่มตั้งแต่ชั่วโมงที่ 96 ในการผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อรา A. niger A185 ในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้กระบวนการหมักแบบ fed-batch culture

เวลา (ชม.)	พีเอช	น้ำหนักเซลล์ (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)	กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)
0	6.4	0.6	175.8	198.5	
12	3.0	0.7	162.3	182.4	2.3
24	2.8	4.9	158.6	172.2	5.8
36	2.5	6.5	142.4	163.8	7.5
48	2.2	9.2	135.7	155.6	12.7
60	2.1	11.2	119.5	147.2	23.6
72	2.1	13.1	112.8	130.5	34.5
84	2.0	14.9	102.8	124.4	49.6
96	1.9	16.7	98.4	116.8	62.7
108	1.8	18.4	82.5	102.2	78.0
120	1.8	20.0	69.2	97.8	88.1
132	1.8	21.4	64.7	86.3	97.2
144	1.8	22.6	58.6	79.2	105.1
156	1.8	23.1	51.3	72.6	112.7
168	1.8	24.2	43.7	58.0	119.2
180	1.8	24.3	34.6	54.8	124.3
192	1.7	24.3	25.7	47.1	128.6
204	1.7	24.4	23.6	44.0	127.1
216	1.7	24.4	21.8	41.6	125.2

ยังมีต่อ...

ตารางที่ 9ข (ต่อ)

เวลา (ชม.)	พีเอช	น้ำหนักเซลล์ (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)	กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)
228	1.7	24.6	22.3	42.3	122.8
240	1.8	25.1	25.5	46.6	121.8
252	1.8	25.9	25.8	47.8	121.6
264	1.8	27.2	27.6	49.3	124.0
276	1.8	27.8	29.3	52.7	120.7
288	1.8	28.4	32.5	55.6	119.9
300	1.8	28.8	38.2	59.2	119.1
312	1.8	31.4	42.4	63.6	119.2

รูปที่ 20 ผลของการเติมแป้งที่ผ่านการย่อยโดยมีอัตราการเติมคงที่ตลอดการเติม ในการผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อรา A. niger A185 ในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้กระบวนการหมักแบบ fed-batch culture

ก) อัตราการเติม 1.92 กรัมต่อชั่วโมง ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 96

ข) อัตราการเติม 2.88 กรัมต่อชั่วโมง ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 96

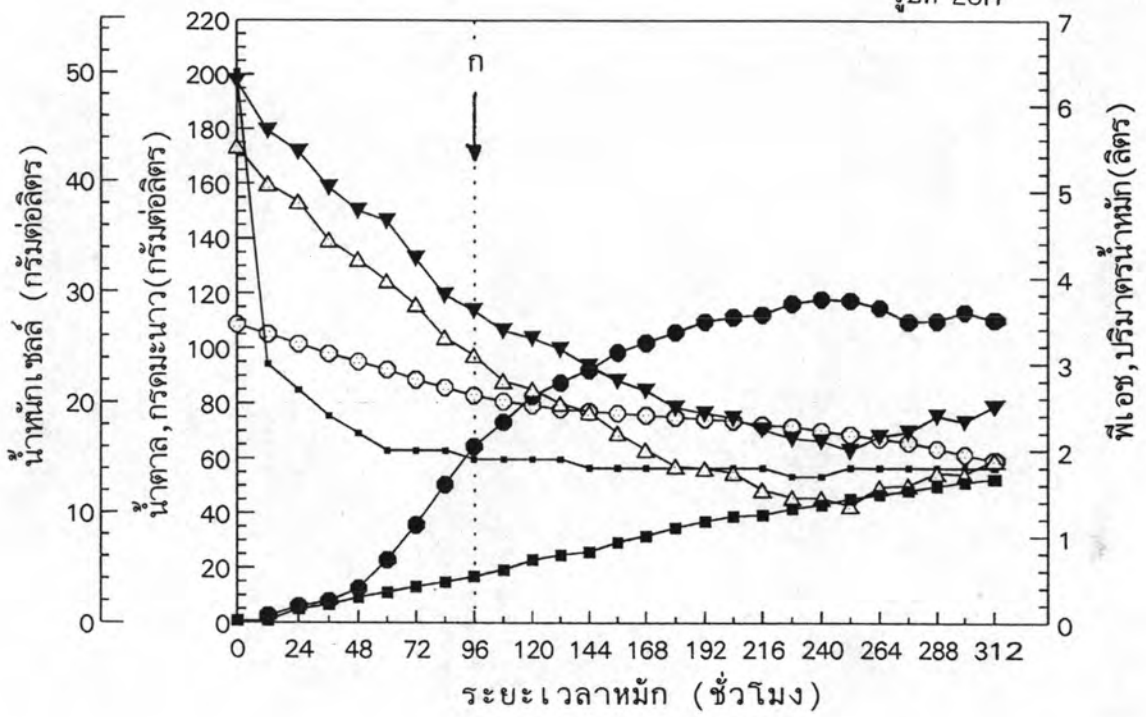
โดยที่

- น้ำหนักเซลล์แห้ง
- น้ำตาลทั้งหมด
- น้ำตาลรีดิวซ์
- กรดมะนาว
- พีเอช
- ปริมาตรน้ำหมัก

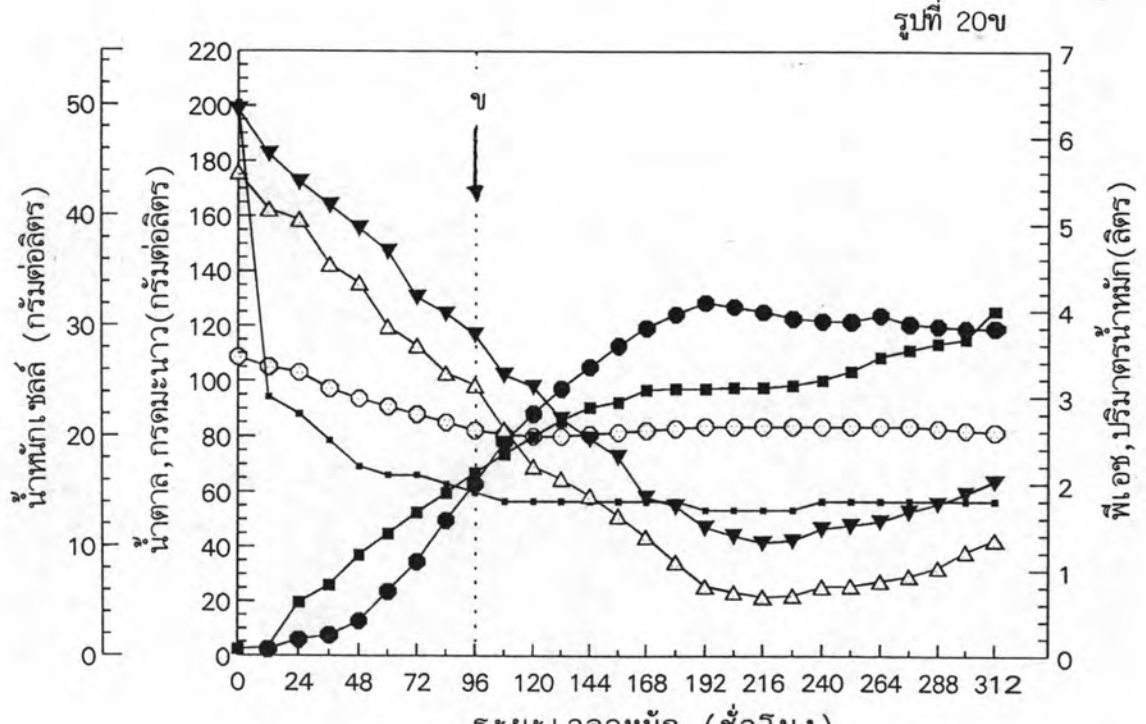
ก. เติมแป้งที่ผ่านการย่อยในอัตรา 1.92 กรัมต่อลิตร

ข. เติมแป้งที่ผ่านการย่อยในอัตรา 2.88 กรัมต่อลิตร

รูปที่ 20ก



รูปที่ 20ข



2.3.2 การเติมแป้งที่ผ่านการย่อยโดยมีการแปรผันอัตราการเติม

จากการทดลองที่ 2.3.1.1 และ 2.3.1.2 จะเห็นว่ามีความแตกต่างกันหลายประการ ทั้งด้านการเจริญของเชื้อรา การใช้น้ำตาล การผลิตกรดมะนาว ซึ่งมีข้อดีข้อเสียแตกต่างกัน ในการทดลองที่ 2.3.1.1 เชื้อราสามารถเจริญได้ดี มีการใช้น้ำตาลน้อย แต่ผลิตกรดมะนาวได้ต่ำ และใช้เวลานาน ส่วนในการทดลองที่ 2.3.1.2 เชื้อราสามารถผลิตกรดมะนาวได้สูง ในเวลาสั้น แต่มีการเจริญต่ำ และมีการใช้น้ำตาลมากกว่า จึงนำมาปรับปรุงอัตราการเติมแป้งที่ผ่านการย่อยให้เหมาะสมขึ้น โดยในระยะแรก ต้องการให้เชื้อรามีการเจริญสูง มีน้ำหนักเซลล์มาก เพื่อที่จะสามารถผลิตกรดมะนาวได้สูงขึ้น จึงใช้อัตราการเติมตามการทดลองที่ 2.3.1.1 คือ เติมแป้งที่ผ่านการย่อยอัตรา 1.92 กรัมต่อชั่วโมง หรือ 0.005 ลิตรต่อชั่วโมง เริ่มตั้งแต่ชั่วโมงที่ 96 แล้วจึงเพิ่มอัตราการเติมเป็น 2.30 กรัมต่อชั่วโมง หรือ 0.006 ลิตรต่อชั่วโมงในชั่วโมงที่ 120 และเพิ่มเป็น 2.88 กรัมต่อชั่วโมง หรือ 0.0075 ลิตรต่อชั่วโมงในชั่วโมงที่ 144 เพื่อให้เชื้อราผลิตกรดมะนาวได้สูงตามการทดลองที่ 2.3.1.2 และหยุดการเติมแป้งที่ผ่านการย่อยในชั่วโมงที่ 168 เพื่อลดปริมาณน้ำตาลที่เหลือในถังหมักซึ่งเห็นว่ายังมีเหลืออยู่ในปริมาณค่อนข้างสูง

เลี้ยงเชื้อรา A. niger A185 ในอาหารเลี้ยงหัวเชื้อ (ภาคผนวก ก 2) บ่มไว้นาน 48 ชั่วโมง นำมาใช้เป็นหัวเชื้อสำหรับผลิตกรดมะนาวในอาหารเลี้ยงเชื้อตามภาคผนวก ก 4 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ปริมาตรเริ่มต้น 3.5 ลิตร ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส อัตราการกวนผสม 500 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1.0 v.v.m. โดยการเติมแป้งที่ผ่านการย่อยในอัตรา 1.92 กรัมต่อชั่วโมง หรือ 0.005 ลิตรต่อชั่วโมง เริ่มตั้งแต่ชั่วโมงที่ 96 และเพิ่มอัตราการเติม 2.30 และ 2.88 กรัมต่อชั่วโมง หรือ 0.006 และ 0.0075 ลิตรต่อชั่วโมง ในชั่วโมงที่ 120 และ 144 ตามลำดับ และหยุดการเติมตั้งแต่ชั่วโมงที่ 168

ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 10 และ รูปที่ 21 จะเห็นว่าการเปลี่ยนแปลงมีการผสมระหว่างการทดลองที่ 2.3.1.1 กับ 2.3.1.2 เมื่อพิจารณาค่าความเป็นกรดด่าง พบว่า มีการเปลี่ยนแปลงเช่นเดียวกับการทดลองที่ 2.3.1.1 และ 2.3.1.2 โดยค่าความเป็นกรดด่างในถังหมักลดลงอย่างรวดเร็วใน 12 ชั่วโมงแรกของการหมัก และค่อยๆลดลงอย่างต่อเนื่องจนกระทั่งคงที่ที่ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 1.8-2.0

ภายในระยะเวลา 72 ชั่วโมง เมื่อพิจารณาน้ำหนักเซลล์แห้ง พบว่า เชื้อรามีการเจริญพอสมควร โดยมีน้ำหนักเซลล์แห้ง 33.1 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 240 ซึ่งมีปริมาณต่ำกว่าการทดลองที่ 2.3.1.1 แต่สูงกว่าการทดลองที่ 2.3.1.2 เมื่อพิจารณาน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือและน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ พบว่า เชื้อรามีการใช้น้ำตาลอย่างต่อเนื่องสอดคล้องกับผลการเจริญของเชื้อรา และในชั่วโมงที่ 204 มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือและน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือต่ำเพียง 20.3 และ 8.3 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อพิจารณาปริมาณกรดมะนาว พบว่า เชื้อราสามารถผลิตกรดมะนาวได้สูงถึง 135.8 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 204 ซึ่งสูงกว่าในการทดลองที่ 2.3.1.1 และ 2.3.1.2

ตารางที่ 10 ผลของการเติมแป้งที่ผ่านการย่อยอัตรา 1.92 กรัมต่อชั่วโมง เริ่มตั้งแต่ชั่วโมงที่ 96 และเพิ่มอัตราการเติมเป็น 2.30 และ 2.88 กรัมต่อชั่วโมง ในชั่วโมงที่ 120 และ 144 ตามลำดับ และหยุดการเติมตั้งแต่ชั่วโมงที่ 168 ในการผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อรา A. niger A185 ในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้กระบวนการหมักแบบ fed-batch culture

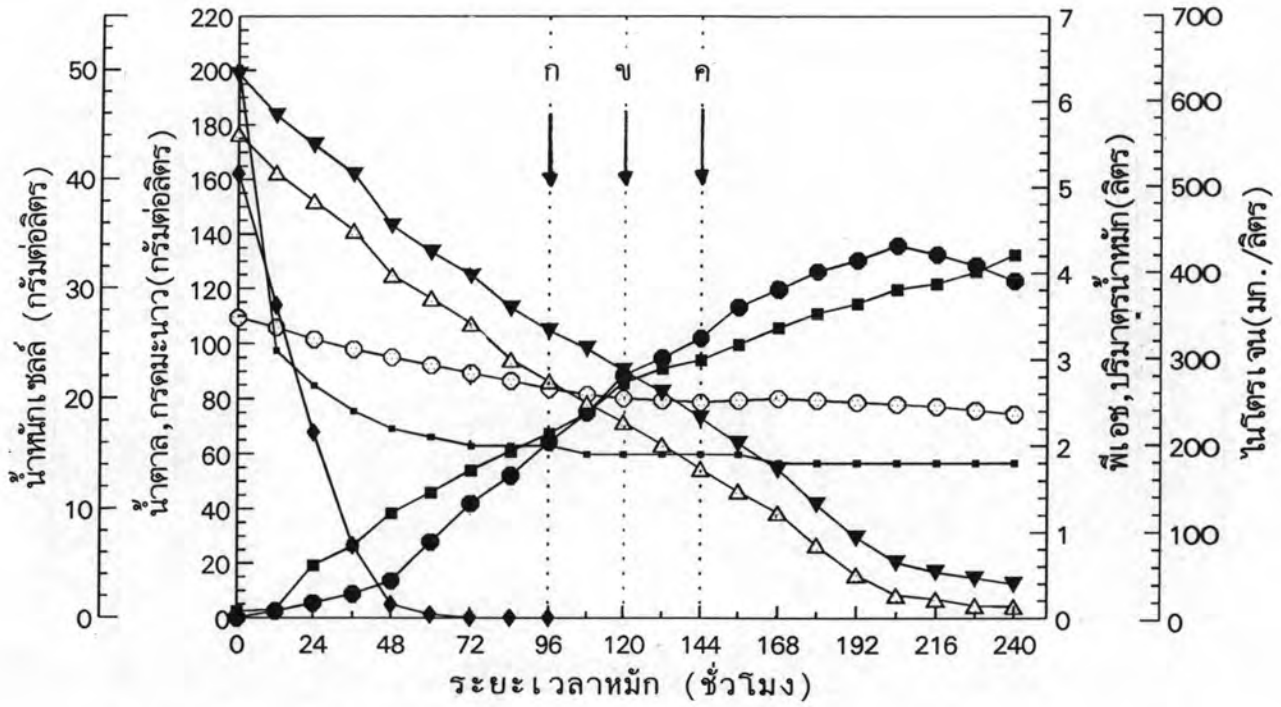
เวลา (ชม.)	พีเอช	น้ำหนักเซลล์ (กรัมต่อลิตร)	ไนโตรเจน (มก.ต่อลิตร)	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)	กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)
0	6.4	0.6	515.9	176.6	198.5	0
12	3.1	0.7	361.9	162.4	183.3	2.4
24	2.7	4.8	215.6	151.9	172.6	5.3
36	2.4	6.6	84.7	141.1	161.8	8.7
48	2.2	9.6	15.4	124.7	143.0	13.5
60	2.1	11.5	3.8	116.2	133.3	27.8
72	2.0	13.5	0.0	107.0	124.7	42.0

ยังมีต่อ...

ตารางที่ 9ข (ต่อ)

เวลา (ชม.)	พีเอช	น้ำหนักเซลล์ (กรัมต่อลิตร)	ไนโตรเจน (มก.ต่อลิตร)	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)	กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)
84	2.0	15.2	0.0	94.1	112.7	52.0
96	2.0	16.8	0.0	86.3	104.5	64.1
108	1.9	18.7	-	78.3	98.1	74.8
120	1.9	21.4	-	71.4	90.2	88.3
132	1.9	22.7	-	63.2	82.2	94.7
144	1.9	23.5	-	54.4	72.8	101.8
156	1.9	24.9	-	46.4	63.7	113.1
168	1.8	26.4	-	38.6	54.3	119.5
180	1.8	27.7	-	26.7	41.8	126.2
192	1.8	28.6	-	15.7	29.5	130.4
204	1.8	29.9	-	8.3	20.3	135.8
216	1.8	30.4	-	6.8	16.8	132.5
228	1.8	31.5	-	4.5	14.5	128.4
240	1.8	33.1	-	4.1	12.4	122.6

- หมายถึง ไม่ได้ทำการวิเคราะห์



รูปที่ 21 ผลของการเติมแป้งที่ผ่านการย่อยโดยมีการแปรผันอัตราการเติมเป็น 1.92 2.30 และ 2.88 กรัมต่อชั่วโมง ในชั่วโมงที่ 96 120 และ 144 ตามลำดับ และหยุดการเติมตั้งแต่ชั่วโมงที่ 168 ของการหมัก ในการผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อรา A. niger A185 ในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้กระบวนการหมักแบบ fed-batch culture

โดยที่

- น้ำหนักเซลล์แห้ง
- น้ำตาลทั้งหมด
- น้ำตาลรีดิวซ์
- กรดมะนาว
- พีเอช
- ปริมาตรน้ำหมัก
- ไนโตรเจน

ก. เติมแป้งที่ผ่านการย่อยในอัตรา 1.92 กรัมต่อชั่วโมง

ข. เติมแป้งที่ผ่านการย่อยในอัตรา 2.30 กรัมต่อชั่วโมง

ค. เติมแป้งที่ผ่านการย่อยในอัตรา 2.88 กรัมต่อชั่วโมง

2.4 ผลของการลดปริมาณสารฟอสเฟตเริ่มต้นในการผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อ A. niger A185 ในกระบวนการหมักแบบ fed-batch culture

จากผลการทดลองที่ผ่านมา จะเห็นว่า เชื้อรามีการใช้สารฟอสเฟตเพียง 48.6 เปอร์เซนต์ ซึ่งมีสารฟอสเฟตเหลือในน้ำหมักถึง 255.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และจากรายงานของ Dawson และคณะ (1989) เสนอว่า การหมักกรดมะนาวไม่จำเป็นต้องมีสารฟอสเฟตเกินพอ โดยควรมีการจำกัดปริมาณสารฟอสเฟต และมีการเติมสารฟอสเฟตระหว่างการหมัก เช่นเดียวกับการเติมสารแหล่งไนโตรเจน ดังนั้นจึงควรมีการจำกัดปริมาณสารฟอสเฟต ซึ่งเป็นสารจำกัดการเจริญ จึงทำการลดปริมาณสารฟอสเฟตลง 50 เปอร์เซนต์ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตกรดมะนาว

เลี้ยงเชื้อรา A. niger A185 ในอาหารเลี้ยงเชื้อหัวเชื้อ (ภาคผนวก ก 2) บ่มไว้นาน 48 ชั่วโมง นำมาใช้เป็นหัวเชื้อสำหรับผลิตกรดมะนาวในอาหารเลี้ยงเชื้อตามภาคผนวก ก 4.1 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ปริมาตรเริ่มต้น 3.5 ลิตร ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส อัตราการให้อากาศเป็น 1.0 v.v.m. อัตราการกวน 500 รอบต่อนาที โดยมีการเติมแป้งที่ผ่านการย่อยในอัตรา 1.92 กรัมต่อชั่วโมง หรือ 0.005 ลิตรต่อชั่วโมง เริ่มตั้งแต่ชั่วโมงที่ 96 และเพิ่มอัตราการเติม 2.30 และ 2.88 กรัมต่อชั่วโมง หรือ 0.006 และ 0.0075 ลิตรต่อชั่วโมง ในชั่วโมงที่ 120 และ 144 ตามลำดับ และหยุดการเติมตั้งแต่ชั่วโมงที่ 168

ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 11 และ รูปที่ 22 จะเห็นว่า มีการเปลี่ยนแปลงแตกต่างจากการหมักกรดมะนาวแบบ fed-batch culture ที่มีปริมาณสารฟอสเฟตเริ่มต้นสูง เมื่อพิจารณาค่าความเป็นกรดด่าง พบว่า ค่าความเป็นกรดด่างลดลงอย่างรวดเร็วใน 12 ชั่วโมง และค่อยๆลดลงอย่างต่อเนื่อง จนกระทั่งค่อนข้างคงที่ที่ 1.3-1.6 ภายในระยะเวลา 108 ชั่วโมง เมื่อพิจารณาน้ำหนักเซลล์แห้ง พบว่า เชื้อรามีการเจริญค่อนข้างต่ำเมื่อเทียบกับการทดลองที่ผ่านมา เมื่อพิจารณาสารแหล่งไนโตรเจน พบว่า เชื้อรามีการใช้สารแหล่งไนโตรเจนอย่างรวดเร็วและใช้หมดภายใน 72 ชั่วโมงแรกของการหมัก เมื่อพิจารณาสารฟอสเฟต พบว่า เชื้อรามีการใช้สารฟอสเฟตอย่างต่อเนื่องซึ่งสอดคล้องกับการใช้สารแหล่งไนโตรเจน และไม่มีการใช้สารฟอสเฟตอีกต่อไปเมื่อสารแหล่งไนโตรเจนถูกใช้หมด ซึ่งยังคงมีสารฟอสเฟตเหลือในน้ำหมักถึง 113-115 มิลลิกรัมต่อลิตร คิดเป็นสารฟอสเฟตที่ถูกใช้เป็น 54 เปอร์เซนต์ เมื่อพิจารณาน้ำตาลที่เหลือทั้งหมดและน้ำตาล

รีดิวซ์ที่เหลือ พบว่า เชื้อรามีการใช้น้ำตาลอย่างต่อเนื่อง โดยในระยะ 168 ชั่วโมงแรก เชื้อรามีการใช้น้ำตาลค่อนข้างสูง ต่อมาการใช้น้ำตาลค่อยๆลดต่ำลง จนมีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือและน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือในชั่วโมงที่ 288 ต่ำเพียง 11.9 และ 3.3 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อพิจารณาปริมาณกรดมะนาว พบว่า ในระยะ 48 ชั่วโมงแรกของการหมัก เชื้อรามีการผลิตกรดมะนาวต่ำ และเมื่อสารแหล่งไนโตรเจนถูกใช้เกือบหมด เชื้อราจึงมีการผลิตกรดมะนาวเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง และผลิตได้สูงสุดถึง 143.0 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 264

จากผลการทดลอง จะเห็นว่า แม้มีการลดปริมาณสารฟอสเฟตลง 50 เปอร์เซนต์ ซึ่งคาดว่าเชื้อราน่าจะนำไปใช้จนเกือบหมด แต่พบว่า เชื้อรามีการใช้สารฟอสเฟตเพียง 54 เปอร์เซนต์ และยังคงมีสารฟอสเฟตเหลือในน้ำหมักสูงถึง 113-115 กรัมต่อลิตร โดยเชื้อรามีการเจริญค่อนข้างต่ำ ซึ่งน่าจะมีผลมาจากปริมาณสารฟอสเฟตไม่สัมพันธ์กับปริมาณสารแหล่งไนโตรเจน นอกจากนั้นยังมีผลทำให้ค่าความเป็นกรดด่างต่ำกว่าปกติ อย่างไรก็ตาม จะเห็นว่า เชื้อราสามารถผลิตกรดมะนาวได้สูงขึ้น แต่ใช้ระยะเวลานานขึ้นเช่นกัน ดังนั้น จึงควรมีการเติมสารแหล่งไนโตรเจนในปริมาณต่ำลงในถังหมัก เพื่อรักษาสภาพเซลล์ ควบคู่กับการเติมน้ำตาล เพื่อให้เชื้อรามีสารอาหารที่ต้องการอย่างครบถ้วน

ตารางที่ 11 ผลของการลดปริมาณสารฟอสเฟตเริ่มต้นในการผลิตกรดมะนาว โดยเชื้อรา A. niger A185 ในกระบวนการหมักแบบ fed-batch culture

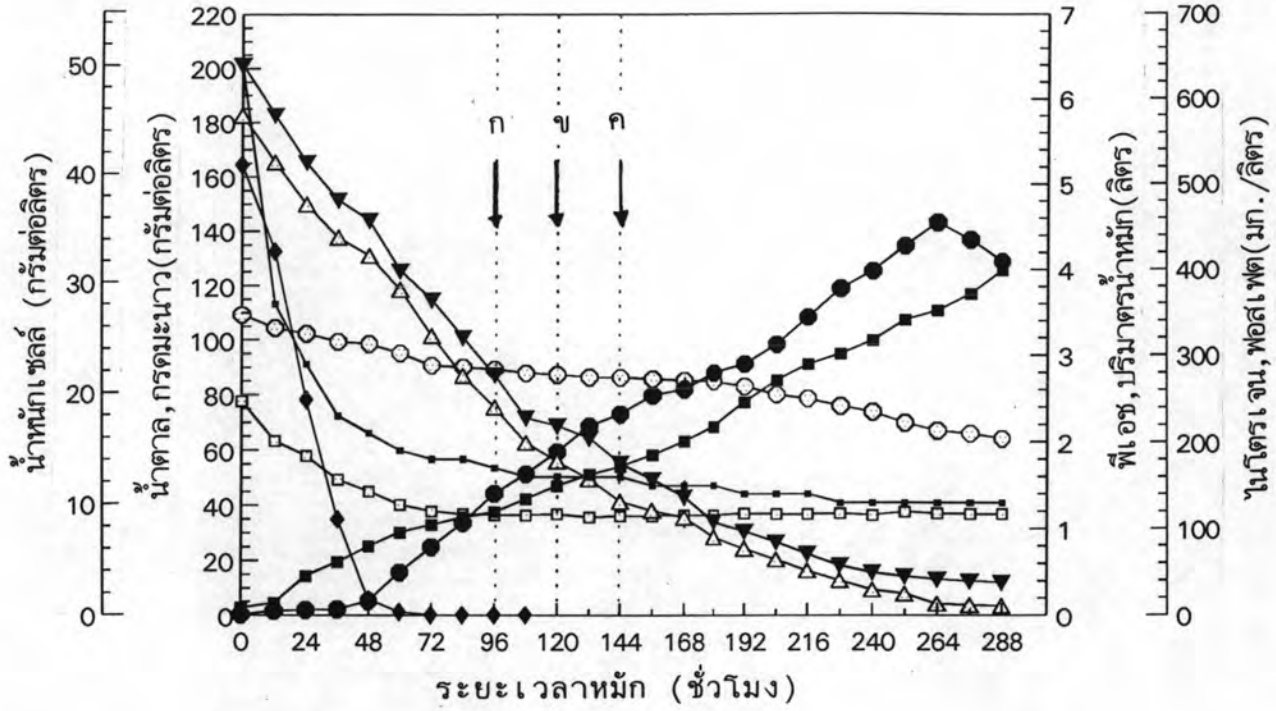
เวลา (ชม.)	พีเอช	น้ำหนักเซลล์ (กรัม/ลิตร)	ไนโตรเจน (มก./ลิตร)	ฟอสเฟต (มก./ลิตร)	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัม/ลิตร)	น้ำตาลทั้งหมด (กรัม/ลิตร)	กรดมะนาว (กรัม/ลิตร)
0	6.4	0.6	522.8	247.0	182.3	201.3	0.1
12	3.6	1.1	421.8	201.0	165.2	182.6	1.5
24	2.9	3.6	248.6	184.0	149.7	165.3	1.8
36	2.3	4.9	110.9	156.7	137.6	151.4	2.1
48	2.1	6.3	18.8	143.1	130.9	143.8	5.1

ยังมีต่อ...

ตารางที่ 11 (ต่อ)

เวลา (ชม.)	พีเอช	น้ำหนักเซลล์ (กรัม/ลิตร)	ไนโตรเจน (มก./ลิตร)	ฟอสเฟต (มก./ลิตร)	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัม/ลิตร)	น้ำตาลทั้งหมด (กรัม/ลิตร)	กรดมะนาว (กรัม/ลิตร)
60	1.9	7.5	3.8	127.8	118.3	125.4	15.6
72	1.8	8.2	0.0	119.9	101.3	114.6	24.8
84	1.8	8.9	0.0	116.8	86.7	100.8	33.4
96	1.7	9.4	0.0	115.8	75.3	87.1	44.1
108	1.6	10.5	0.0	115.5	62.5	71.5	51.2
120	1.6	11.7	-	116.8	55.8	68.7	59.0
132	1.6	12.8	-	113.1	49.4	64.2	68.5
144	1.6	13.5	-	114.6	41.2	55.0	72.8
156	1.5	14.5	-	114.8	38.0	49.3	79.6
168	1.5	15.8	-	115.4	35.4	42.8	81.8
180	1.5	17.1	-	115.4	28.3	33.9	87.8
192	1.4	19.3	-	117.5	24.2	30.4	91.0
204	1.4	21.3	-	116.8	20.3	26.6	98.1
216	1.4	22.7	-	116.8	16.3	22.4	108.1
228	1.3	23.6	-	117.5	12.7	18.2	118.6
240	1.3	24.9	-	115.4	9.3	15.6	125.2
252	1.3	26.8	-	119.2	7.8	14.2	134.4
264	1.3	27.6	-	117.5	4.1	13.1	143.0
276	1.3	29.2	-	116.8	3.6	12.4	136.6
288	1.3	31.3	-	116.8	3.3	11.9	128.7

- หมายถึง ไม่ได้ทำการวิเคราะห์



รูปที่ 22 ผลของการลดปริมาณสารฟอสเฟตเริ่มต้นในการผลิตกรดมะนาวที่มีการเติมแป้งที่ผ่านการย่อยโดยการแปรผันอัตราการเติมเป็น 1.92 2.30 และ 2.88 กรัมต่อชั่วโมง ในชั่วโมงที่ 96 120 และ 144 ตามลำดับ และหยุดการเติมตั้งแต่ชั่วโมงที่ 168 ของการหมักโดยเชื้อรา A. niger A185 ในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้กระบวนการหมักแบบ fed-batch culture

โดยที่

- น้ำหนักเซลล์แห้ง
- น้ำตาลทั้งหมด
- น้ำตาลรีดิวซ์
- กรดมะนาว
- พีเอช
- ปริมาตรน้ำหมัก
- ไนโตรเจน
- ฟอสเฟต

ก. เติมแป้งที่ผ่านการย่อยในอัตรา 1.92 กรัมต่อชั่วโมง

ข. เติมแป้งที่ผ่านการย่อยในอัตรา 2.30 กรัมต่อชั่วโมง

ค. เติมแป้งที่ผ่านการย่อยในอัตรา 2.88 กรัมต่อชั่วโมง

2.5 <u>ผลของการเติมแอมโมเนียมซัลเฟตและแป้งที่ผ่านการย่อยในระหว่างการหมัก เพื่อใช้เป็นสารแหล่งไนโตรเจนและสารแหล่งคาร์บอนในการผลิตกรดมะนาว โดยเชื้อ A. niger A185 ในกระบวนการหมักแบบ fed-batch culture</u>

จากผลการทดลองที่ผ่านมา ชี้ให้เห็นว่า ไนโตรเจนเป็นสารจำกัดการเจริญ โดยเชื้อรามีการใช้ไนโตรเจนหมดภายในระยะแรกของการหมัก (72 ชั่วโมงแรก) สอดคล้องกับผลการทดลองของ Choe และ Young (1991) ซึ่งไนโตรเจนถูกใช้หมดภายในชั่วโมงที่ 50 และผลการทดลองของ Dawson และคณะ(1988) พบว่า ไนโตรเจนถูกใช้หมดภายในวันที่ 5 และไม่มีการใช้ฟอสเฟตอีกต่อไป ในกระบวนการหมักจะมีการผลิตกรดมะนาวเกิดขึ้นก่อนไนโตรเจนถูกใช้หมด (Choe and Young, 1991; Dawson et.al., 1988; Kristiansen and Sinclair,1978) Choe และ Young เสนอว่า เชื้อราต้องการสารแหล่งไนโตรเจนปริมาณเล็กน้อยสำหรับรักษาแอคทิวิตีของเซลล์ให้คงอยู่ และสำหรับป้องกันการสร้างสปอร์ Kristiansen และ Sinclair (1979) รายงานว่า เมื่อมีการเพิ่มปริมาณไนโตรเจน อัตราการสร้างเซลล์สะสมคาร์บอนจะเพิ่มขึ้น ทำให้มีการผลิตกรดมะนาวเพิ่มขึ้นด้วย ดังนั้นในการหมักแบบ fed-batch culture จึงควรมีการเติมสารแหล่งไนโตรเจนในระหว่างการหมัก ให้เพียงพอต่อความต้องการของเชื้อราในการรักษาแอคทิวิตีของเซลล์ เพื่อเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตกรดมะนาว ในการวิจัยนี้จะใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นสารแหล่งไนโตรเจนที่ใช้เติม โดยเริ่มมีการเติมสารในชั่วโมงที่ 72 ของการหมัก ส่วนปริมาณ ความเข้มข้น และอัตราการเติมสาร จะใช้ผลการทดลองของ Dawson และคณะ (1988) เป็นแนวทางในการทดลอง

เลี้ยงเชื้อรา <u>A. niger</u> A185 ในอาหารเลี้ยงเชื้อหัวเชื้อ (ภาคผนวก ก 2) บ่มไว้นาน 48 ชั่วโมง นำมาใช้เป็นหัวเชื้อสำหรับผลิตกรดมะนาวในอาหารเลี้ยงเชื้อตามภาคผนวก ก 4 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ปริมาตรเริ่มต้น 3.5 ลิตร ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส อัตราการให้อากาศ 1.0 v.v.m. อัตราการกวน 500 รอบต่อนาที โดยมีการเติมแอมโมเนียมซัลเฟตอัตรา 3.30 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อชั่วโมง หรือ 0.004 ลิตรต่อชั่วโมง เริ่มตั้งแต่ชั่วโมงที่ 72 และเพิ่มอัตราการเติมเป็น 4.12 และ 4.95 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อชั่วโมง หรือ 0.005 และ 0.006 ลิตรต่อชั่วโมง ในชั่วโมงที่ 120 และ 144 ตามลำดับ และหยุดการเติมตั้งแต่ชั่วโมงที่ 168 และมีการเติมแป้งที่ผ่านการย่อยในอัตรา 1.92 กรัมต่อชั่วโมง หรือ 0.005 ลิตรต่อชั่วโมง เริ่มตั้งแต่ชั่วโมงที่ 96

และเพิ่มอัตราการเติมเป็น 2.30 และ 2.88 กรัมต่อชั่วโมง หรือ 0.006 และ 0.0075 ลิตรต่อชั่วโมง ในชั่วโมงที่ 120 และ 144 ตามลำดับ และหยุดการเติมตั้งแต่ชั่วโมงที่ 168

ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 12 และรูปที่ 23 จะเห็นว่า การเติมแอมโมเนียมซัลเฟต ซึ่งเป็นสารจำกัดการเจริญในระหว่างการหมักกรดมะนาว โดยมีเติมก่อนสารแหล่งไนโตรเจนถูกใช้หมด เชื้อราสามารถผลิตกรดมะนาวได้สูงขึ้น เมื่อพิจารณาค่าความเป็นกรดด่าง พบว่า ค่าความเป็นกรดด่างลดลงอย่างรวดเร็วใน 12 ชั่วโมง และค่อยๆลดลงอย่างต่อเนื่องจนกระทั่งค่อนข้างคงที่ที่ 1.9 ภายในระยะเวลา 84 ชั่วโมง และลดต่ำลงอย่างเห็นได้ชัดเมื่อน้ำตาลถูกใช้หมด เมื่อพิจารณาน้ำหนักเซลล์แห้ง พบว่า เชื้อรามีการเจริญพอควร เมื่อพิจารณาสารแหล่งไนโตรเจน พบว่า เชื้อรามีการใช้สารแหล่งไนโตรเจนอย่างรวดเร็ว และใช้เกือบหมดภายใน 72 ชั่วโมงแรกของการหมัก หลังจากนั้น เชื้อรามีการใช้สารแหล่งไนโตรเจนที่ได้จากแอมโมเนียมซัลเฟตที่เติมในระหว่างการหมัก และมีสารแหล่งไนโตรเจนเหลือในน้ำหมักเล็กน้อย 15.1-35.1 มิลลิกรัมต่อลิตร แสดงว่า เชื้อราไม่สามารถใช้สารแหล่งไนโตรเจนที่เติมได้หมด เมื่อพิจารณาสารฟอสเฟต พบว่า เชื้อรามีการใช้สารฟอสเฟตอย่างต่อเนื่องสอดคล้องกับการใช้สารแหล่งไนโตรเจน และไม่มีการใช้สารฟอสเฟตอีกต่อไป เมื่อไนโตรเจนถูกใช้เกือบหมดและยังคงมีสารฟอสเฟตเหลือในน้ำหมักถึง 91.6-94.6 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อพิจารณาน้ำตาลที่เหลือทั้งหมดและน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ พบว่า เชื้อรามีการใช้น้ำตาลอย่างต่อเนื่อง โดยในระยะแรก เชื้อรามีการใช้น้ำตาลค่อนข้างสูง ต่อมาการใช้น้ำตาลค่อยๆลดต่ำลงจนมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์หมดในชั่วโมงที่ 216 แต่คงมีน้ำตาลเหลืออยู่ทั้งหมด 12.6 กรัมต่อลิตร คาดว่าเป็นน้ำตาลในรูปที่เชื้อไม่สามารถนำไปใช้ได้ เมื่อพิจารณาปริมาณกรดมะนาว พบว่า ในระยะ 48 ชั่วโมงแรกของการหมัก เชื้อรามีการผลิตกรดมะนาวต่ำ และเมื่อสารแหล่งไนโตรเจนถูกใช้เกือบหมดใน 72 ชั่วโมงแรก เชื้อราจึงมีการผลิตกรดมะนาวเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง และผลิตได้สูงสุดถึง 147.9 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 192

จากผลการทดลอง เมื่อมีการเติมสารแหล่งไนโตรเจนในระหว่างการหมักก่อนไนโตรเจนถูกใช้หมด พบว่า เชื้อราสามารถผลิตกรดมะนาวได้สูงขึ้น โดยสารแหล่งไนโตรเจนที่เติมนั้น เชื้อราไม่ได้นำไปใช้ในการเจริญเติบโต โดยคาดว่าเชื้อราใช้สารแหล่งไนโตรเจนเพื่อรักษาสภาพเซลล์ให้มีแอคทิวิตีคงอยู่ ซึ่งมีผลทำให้ประสิทธิภาพในการผลิตกรดมะนาวเพิ่มขึ้น และทำให้เชื้อราสามารถใช้สารแหล่งคาร์บอนได้อย่างเต็มที่จนปริมาณน้ำตาล

รีดิวซ์ถูกใช้หมด ดังนั้น จึงควรมีการเติมสารแหล่งคาร์บอนเพิ่มขึ้น เพื่อให้เชื้อรามีสารอาหารที่ต้องการในการผลิตกรดมะนาวได้อย่างเพียงพอ

ตารางที่ 12 ผลของการเติมแอมโมเนียมซัลเฟตและแป้งที่ผ่านการย่อย* ในการผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อรา A. niger A185 ในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้กระบวนการหมักแบบ fed-batch culture

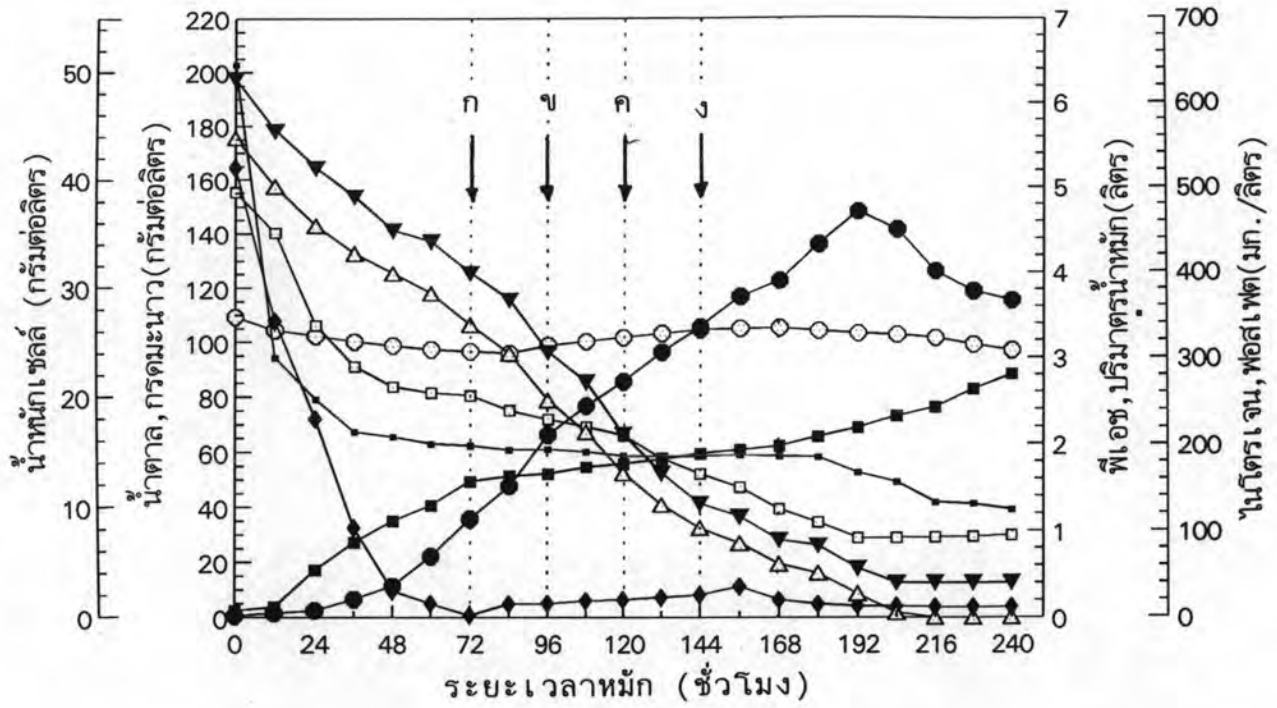
เวลา (ชม.)	พีเอช	น้ำหนักเซลล์ (กรัม/ลิตร)	ไนโตรเจน (มก./ลิตร)	ฟอสเฟต (มก./ลิตร)	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัม/ลิตร)	น้ำตาลทั้งหมด (กรัม/ลิตร)	กรดมะนาว (กรัม/ลิตร)
0	6.4	0.6	523.1	494.3	175.4	197.5	0.5
12	3.0	0.9	342.7	446.2	157.3	178.2	1.5
24	2.5	4.3	228.7	337.2	142.7	164.3	2.4
36	2.1	6.8	103.2	289.6	132.6	153.6	6.5
48	2.1	8.7	30.1	265.8	125.1	141.0	11.2
60	2.0	10.1	15.7	258.8	117.8	137.1	22.0
72	2.0	12.3	2.0	255.6	106.1	125.4	35.6
84	1.9	12.8	15.1	238.4	95.7	115.4	47.6
96	1.9	13.0	15.7	228.2	78.6	96.2	66.1
108	1.9	13.6	18.8	219.4	67.1	85.2	76.5

ยังมีต่อ...

* หมายถึง การเติมแอมโมเนียมซัลเฟตตั้งแต่ชั่วโมงที่ 72 ในอัตรา 3.30 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อชั่วโมง และมีการเติมแป้งที่ผ่านการย่อยตั้งแต่ชั่วโมงที่ 96 ในอัตรา 1.92 กรัมต่อลิตร และเพิ่มอัตราการเติมในชั่วโมงที่ 120 และ 144 เป็น 4.12 และ 4.95 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อชั่วโมง และ 2.30 และ 2.88 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และหยุดการเติมตั้งแต่ชั่วโมงที่ 168

ตารางที่ 12 (ต่อ)

เวลา (ชม.)	พีเอช	น้ำหนักเซลล์ (กรัม/ลิตร)	ไนโตรเจน (มก./ลิตร)	ฟอสเฟต (มก./ลิตร)	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัม/ลิตร)	น้ำตาลทั้งหมด (กรัม/ลิตร)	กรดมะนาว (กรัม/ลิตร)
120	1.9	13.9	20.1	209.8	52.5	66.4	85.3
132	1.9	14.3	22.6	183.2	40.7	52.2	96.0
144	1.9	14.8	25.4	165.8	32.4	41.2	105.3
156	1.9	15.2	35.1	149.9	26.8	36.5	116.5
168	1.9	15.5	20.1	124.9	19.3	28.1	122.3
180	1.8	16.4	15.1	109.7	16.0	26.1	135.9
192	1.7	17.2	13.2	91.6	8.5	17.8	147.9
204	1.6	18.2	12.5	91.6	1.6	12.5	141.3
216	1.3	19.0	12.0	92.5	0.0	12.6	126.1
228	1.3	20.7	12.0	93.2	0.0	12.6	118.6
240	1.2	22.0	12.0	94.6	0.0	12.6	115.2



รูปที่ 23 ผลของการเติมแอมโมเนียมซัลเฟตในอัตรา 3.30 4.12 และ 4.95 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อชั่วโมง ในชั่วโมงที่ 72 120 และ 144 ตามลำดับ และหยุดการเติมตั้งแต่ชั่วโมงที่ 168 ของการหมัก และเติมแป้งที่ผ่านการย่อยในอัตรา 1.92 2.30 และ 2.88 กรัมต่อชั่วโมง ในชั่วโมงที่ 96 120 และ 144 ตามลำดับ และหยุดการเติมในชั่วโมงที่ 168 ของการหมัก เพื่อใช้เป็นสารแหล่งไนโตรเจนและสารแหล่งคาร์บอน ในการผลิตกรดมะนาว โดยเชื้อรา A. niger A185 ในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้กระบวนการหมักแบบ fed-batch culture

โดยที่

- น้ำหนักเซลล์แห้ง
- น้ำตาลทั้งหมด
- น้ำตาลรีดิวซ์
- กรดมะนาว
- พีเอช
- ปริมาตรน้ำหมัก
- ไนโตรเจน
- ฟอสเฟต

ก. เติมแอมโมเนียมซัลเฟตในอัตรา 3.30 มก.ต่อชั่วโมง

ข. เติมแอมโมเนียมซัลเฟตในอัตรา 3.30 มก.ต่อชั่วโมง
เติมแป้งที่ผ่านการย่อยในอัตรา 1.92 กรัมต่อชั่วโมง

ค. เติมแอมโมเนียมซัลเฟตในอัตรา 4.12 มก.ต่อชั่วโมง
เติมแป้งที่ผ่านการย่อยในอัตรา 2.30 กรัมต่อชั่วโมง

ง. เติมแอมโมเนียมซัลเฟตในอัตรา 4.95 มก.ต่อชั่วโมง
เติมแป้งที่ผ่านการย่อยในอัตรา 2.88 กรัมต่อชั่วโมง

2.6 <u>ผลของการเพิ่มอัตราการเติมแป้งที่ผ่านการย่อย ในระหว่างการหมักที่มีการเติมแป้งที่ผ่านการย่อยและแอมโมเนียมซัลเฟต เพื่อใช้เป็นสารแหล่งคาร์บอนและสารแหล่งไนโตรเจนในการผลิตกรดมะนาว โดยเชื้อ A. niger A185 โดยใช้กระบวนการหมักแบบ fed-batch culture</u>

จากผลการทดลองข้อ 2.4 จะเห็นว่า ควรมีการเพิ่มปริมาณและอัตราการเติมสารแหล่งคาร์บอน เพื่อให้เชื้อรามีการใช้น้ำตาลและไนโตรเจนมากขึ้น ซึ่งจะทำให้สามารถผลิตกรดมะนาวได้มากขึ้นด้วย

เลี้ยงเชื้อรา <u>A. niger</u> A185 ในอาหารเลี้ยงเชื้อหัวเชื้อ (ภาคผนวก ก 2) บ่มไว้นาน 48 ชั่วโมง นำมาใช้เป็นหัวเชื้อสำหรับผลิตกรดมะนาวในอาหารเลี้ยงเชื้อตามภาคผนวก ก 4 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ปริมาตรเริ่มต้น 3.5 ลิตร ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส อัตราการให้อากาศ 1.0 v.v.m. อัตราการกวน 500 รอบต่อนาที โดยมีการเติมแอมโมเนียมซัลเฟตอัตรา 3.30 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อชั่วโมง หรือ 0.004 ลิตรต่อชั่วโมง เริ่มตั้งแต่ชั่วโมงที่ 72 และเพิ่มอัตราการเติมเป็น 4.12 และ 4.95 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อชั่วโมง หรือ 0.005 และ 0.006 ลิตรต่อชั่วโมง ในชั่วโมงที่ 120 และ 144 ตามลำดับ และหยุดการเติมตั้งแต่ชั่วโมงที่ 168 และมีการเติมแป้งที่ผ่านการย่อยในอัตรา 2.30 กรัมต่อชั่วโมง หรือ 0.006 ลิตรต่อชั่วโมง เริ่มตั้งแต่ชั่วโมงที่ 96 และเพิ่มอัตราการเติมเป็น 2.88 และ 3.07 กรัมต่อชั่วโมง หรือ 0.0075 และ 0.008 ลิตรต่อชั่วโมง ในชั่วโมงที่ 120 และ 144 ตามลำดับ และหยุดการเติมตั้งแต่ชั่วโมงที่ 168

ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 13 และรูปที่ 24 จะเห็นว่า การเพิ่มปริมาณและอัตราการเติมแป้งที่ผ่านการย่อย เชื้อราสามารถผลิตกรดมะนาวได้สูงขึ้น เมื่อพิจารณาค่าความเป็นกรดด่าง พบว่า ค่าความเป็นกรดด่างลดลงอย่างรวดเร็วใน 12 ชั่วโมง และค่อยๆลดลงอย่างต่อเนื่องจนกระทั่งค่อนข้างคงที่ที่ 1.9 ภายในระยะเวลา 84 ชั่วโมง เมื่อพิจารณาน้ำหนักเซลล์แห้ง พบว่า เชื้อรามีการเจริญพอสมควร เมื่อพิจารณาสารแหล่งไนโตรเจน พบว่า เชื้อรามีการใช้สารแหล่งไนโตรเจนอย่างรวดเร็ว และใช้เกือบหมดภายใน 72 ชั่วโมงแรกของการหมัก หลังจากนั้น เชื้อรามีการใช้สารแหล่งไนโตรเจนที่ได้จากแอมโมเนียมซัลเฟตที่เติมในระหว่างการหมัก และมีสารแหล่งไนโตรเจนเหลือในน้ำหมักเล็กน้อย เมื่อพิจารณาสารฟอสเฟต พบว่า เชื้อรามีการใช้สารฟอสเฟตอย่างต่อเนื่องสอดคล้องกับการใช้สารแหล่งไนโตรเจน และยังคงมีสารฟอสเฟตเหลือในน้ำหมัก

เมื่อพิจารณาน้ำตาลที่เหลือทั้งหมดและน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ พบว่า เชื้อรามีการใช้น้ำตาลอย่างต่อเนื่อง โดยในระยะแรกเชื้อรามีการใช้น้ำตาลค่อนข้างสูง ต่อมาการใช้น้ำตาลค่อยๆ ลดต่ำลง เมื่อพิจารณาปริมาณกรดมะนาว พบว่า ในระยะ 48 ชั่วโมงแรกของการหมักเชื้อรามีการผลิตกรดมะนาวต่ำ และเมื่อสารแหล่งไนโตรเจนถูกใช้เกือบหมดใน 72 ชั่วโมงแรก เชื้อราจึงมีการผลิตกรดมะนาวเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง และผลิตได้สูงสุดถึง 156.5 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 240

ตารางที่ 13 ผลของการเพิ่มอัตราการเติมแป้งที่ผ่านการย่อย ในระหว่างการหมักที่มีการเติมแป้งที่ผ่านการย่อยและแอมโมเนียมซัลเฟต เพื่อใช้เป็นสารแหล่งคาร์บอนและสารแหล่งไนโตรเจน* ในการผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อรา A. niger A185 ในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้กระบวนการหมักแบบ fed-batch culture

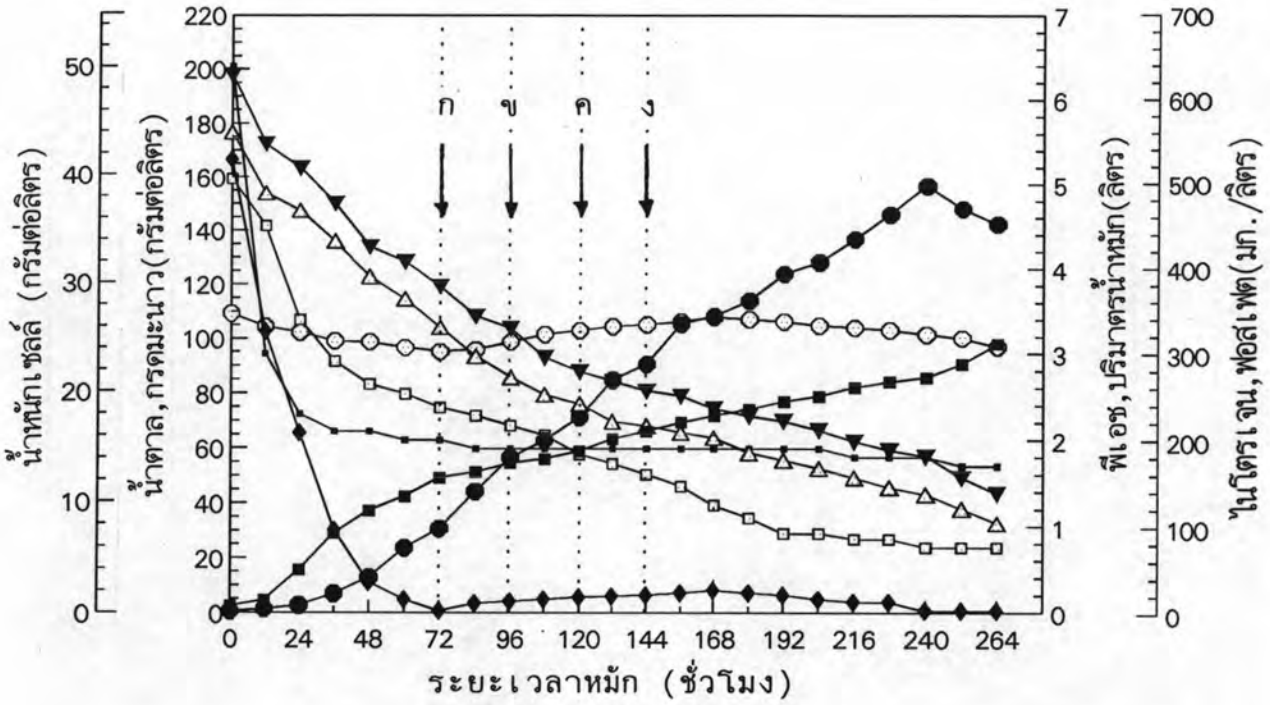
เวลา (ชม.)	พีเอช	น้ำหนักเซลล์ (กรัม/ลิตร)	ไนโตรเจน (มก./ลิตร)	ฟอสเฟต (มก./ลิตร)	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัม/ลิตร)	น้ำตาลทั้งหมด (กรัม/ลิตร)	กรดมะนาว (กรัม/ลิตร)
0	6.4	0.6	529.8	506.5	176.6	197.8	0.4
12	3.0	1.1	326.4	450.7	153.8	172.3	1.3
24	2.3	3.9	208.5	340.0	147.2	163.2	2.6
36	2.1	7.2	95.7	291.0	135.8	150.0	6.8

ยังมีต่อ...

* หมายถึง การเติมแอมโมเนียมซัลเฟตตั้งแต่ชั่วโมงที่ 72 ในอัตรา 3.30 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อชั่วโมง และมีการเติมแป้งที่ผ่านการย่อยตั้งแต่ชั่วโมงที่ 96 ในอัตรา 2.30 กรัมต่อลิตร และเพิ่มอัตราการเติมในชั่วโมงที่ 120 และ 144 เป็น 4.12 และ 4.95 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อชั่วโมง และ 2.88 และ 3.07 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และหยุดการเติมตั้งแต่ชั่วโมงที่ 168

ตารางที่ 13 (ต่อ)

เวลา (ชม.)	พีเอช	น้ำหนักเซลล์ (กรัม/ลิตร)	ไนโตรเจน (มก./ลิตร)	ฟอสเฟต (มก./ลิตร)	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัม/ลิตร)	น้ำตาลทั้งหมด (กรัม/ลิตร)	กรดมะนาว (กรัม/ลิตร)
48	2.1	9.3	35.1	264.4	122.6	133.8	12.7
60	2.0	10.6	15.1	253.3	114.4	128.3	23.5
72	2.0	12.3	2.0	237.6	104.0	119.2	30.6
84	1.9	12.8	10.6	228.2	93.2	108.2	44.1
96	1.9	13.6	12.8	216.5	85.6	103.6	56.4
108	1.9	14.0	15.1	205.6	79.3	92.8	62.6
120	1.9	14.7	17.6	183.2	75.9	87.6	71.1
132	1.9	15.8	18.8	172.5	69.5	84.2	84.6
144	1.9	16.5	20.1	160.3	67.9	80.7	90.3
156	1.9	17.3	22.6	146.4	65.5	78.8	105.2
168	1.9	17.9	25.4	124.5	63.6	74.2	108.1
180	1.9	18.5	22.6	109.7	58.1	71.5	113.8
192	1.9	19.2	20.1	91.6	55.4	69.7	123.7
204	1.9	19.7	15.1	91.6	52.5	66.4	128.0
216	1.8	20.5	12.0	85.2	49.1	62.3	136.6
228	1.8	21.0	12.0	85.2	45.6	59.1	145.8
240	1.8	21.4	2.0	75.6	43.0	56.8	156.5
252	1.7	22.6	2.0	75.6	37.8	49.2	147.9
264	1.7	24.5	2.0	75.6	32.6	43.5	142.2



รูปที่ 24 ผลของการเติมแอมโมเนียมซัลเฟตในอัตรา 3.30 4.12 และ 4.95 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อชั่วโมง ในชั่วโมงที่ 72 120 และ 144 ตามลำดับ และหยุดการเติมตั้งแต่ชั่วโมงที่ 168 ของการหมัก และเติมแป้งที่ผ่านการย่อยในอัตรา 2.30 2.88 และ 3.07 กรัมต่อชั่วโมง ในชั่วโมงที่ 96 120 และ 144 ตามลำดับ และหยุดการเติมในชั่วโมงที่ 168 ของการหมัก เพื่อใช้เป็นสารแหล่งไนโตรเจนและสารแหล่งคาร์บอน ในการผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อรา A. niger A185 ในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้กระบวนการหมักแบบ fed-batch culture

โดยที่

- น้ำหนักเซลล์แห้ง
- น้ำตาลทั้งหมด
- น้ำตาลรีดิวซ์
- กรดมะนาว
- พีเอช
- ปริมาตรน้ำหมัก
- ไนโตรเจน
- ฟอสเฟต

ก. เติมแอมโมเนียมซัลเฟตในอัตรา 3.30 มก.ต่อชั่วโมง

ข. เติมแอมโมเนียมซัลเฟตในอัตรา 3.30 มก.ต่อชั่วโมง
เติมแป้งที่ผ่านการย่อยในอัตรา 2.30 กรัมต่อชั่วโมง

ค. เติมแอมโมเนียมซัลเฟตในอัตรา 4.12 มก.ต่อชั่วโมง
เติมแป้งที่ผ่านการย่อยในอัตรา 2.88 กรัมต่อชั่วโมง

ง. เติมแอมโมเนียมซัลเฟตในอัตรา 4.95 มก.ต่อชั่วโมง
เติมแป้งที่ผ่านการย่อยในอัตรา 3.07 กรัมต่อชั่วโมง

3. วิเคราะห์และเปรียบเทียบข้อมูลเชิงจลนศาสตร์ ระหว่างการหมักกรดมะนาวในระดับขวดเขย่ากับในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้กระบวนการหมักแบบ batch culture และแบบ fed-batch culture

จากการวิเคราะห์และเปรียบเทียบข้อมูลเชิงจลนศาสตร์ ระหว่างการหมักกรดมะนาวในระดับขวดเขย่ากับในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร ซึ่งมีกระบวนการหมักแบบ batch culture และแบบ fed-batch culture แสดงดังในตารางที่ 14

ตารางที่ 14 เปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิตกรดมะนาวระหว่างการหมักแบบขวดเขย่า batch culture และ fed-batch culture ในการผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อรา A. niger A185

รูปแบบการหมัก	เวลาหมัก * (ชม.)	กรดมะนาว (กรัม/ลิตร)	ปริมาตรน้ำหมัก (ลิตร)	ผลผลิต ** (%)	กำลังการผลิตทั้งหมด*** (กรัม/ลิตร/ชม.)
ขวดเขย่า	240	127.8	-	83.2	0.532
batch	204	115.3	2.204	63.2	0.565
fed-batch					
-เติมน้ำตาล	240	135.8	2.477	76.2	0.666
-เติมน้ำตาลและไนโตรเจน	192	147.9	3.227	82.3	0.770

* หมายถึง ระยะเวลาที่ผลิตกรดมะนาวได้สูงสุด

** ผลผลิต(%) = $\frac{\text{ปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตทั้งหมด (กรัม)} \times 100}{\text{ปริมาณน้ำตาลที่ใช้ทั้งหมด (กรัม)}}$

*** กำลังการผลิตทั้งหมด (กรัม/ลิตร/ชม.) = $\frac{\text{ปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตทั้งหมด (กรัม)}}{\text{ปริมาตรน้ำหมักทั้งหมด (ลิตร)} \times \text{เวลาที่ใช้หมัก (ชม.)}}$