

การผลิตกระดาษโดยวิธีรีไซเคิลกับการแยกผลิตภัณฑ์ด้วยเรซินแลกเปลี่ยนไอออน



นางสาวอุดมพร มณีรัตน์

สถาบันวิทยบริการ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2548

ISBN 974-53-2973-8

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CITRIC ACID PRODUCTION BY YEAST WITH IN-SITU
PRODUCT SEPARATION BY ION-EXCHANGE RESIN



Miss Udornporn Maneerat

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Biotechnology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2005

ISBN 974-53-2973-8

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การผลิตกรดอะมิโนโดยยีสต์ควบคู่กับการแยกผลิตภัณฑ์ด้วยเรซินแลกเปลี่ยนไอออน

โดย นางสาวอุคมพร มณีรัตน์


สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุรพงษ์ นวังคสัตถุศาสน์

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม อาจารย์วาสนา โตเลี้ยง

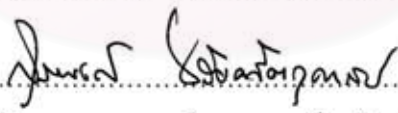
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ดร.กิตตินันท์ โกมลภิส

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาโท



..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร.เปี่ยมศักดิ์ เมณะเสวต)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์


..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.อมร เพชรสม)


..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุรพงษ์ นวังคสัตถุศาสน์)


..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(อาจารย์วาสนา โตเลี้ยง)


..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ดร.กิตตินันท์ โกมลภิส)


..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พลกฤษณ์ แสงวนิช)

อุคมพร มณีรัตน์ : การผลิตกรดมะนาวโดยยีสต์ควบคู่กับการแยกผลิตภัณฑ์ด้วยเรซินแลกเปลี่ยนไอออน (CITRIC ACID PRODUCTION BY YEAST WITH IN-SITU PRODUCT SEPARATION BY ION-EXCHANGE RESIN) อาจารย์ที่ปรึกษา : ผศ.ดร. สุรพงศ์ นวังคสัตถุศาสน์, อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม : อาจารย์वासना โดเลียง, ดร.กิตตินันท์ โกมลภิส, 131 หน้า. ISBN 974-53-2973-8

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนากระบวนการผลิตกรดมะนาวด้วยยีสต์ *Candida oleophila* NNU-62 การแยกกรดมะนาวระหว่างการหมักด้วยเรซินแลกเปลี่ยนไอออนถูกนำมาศึกษาเพื่อเพิ่มผลผลิตและอัตราการผลิต ทำการตรึงเซลล์ยีสต์ 8.15 กรัม/น้ำหนักแห้งต่อลิตร ปริมาตร 75 มิลลิลิตรในสารละลายอัลจินेटที่ความเข้มข้นร้อยละ 4 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 75 มิลลิลิตร ศึกษาเปรียบเทียบการผลิตกรดมะนาวด้วยยีสต์ตรึงใน 3 สภาวะคือในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่อัตราการกวน 50 รอบต่อนาที, ไม่กวนผสม (อัตราการให้อากาศ 1.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที) และในถังหมักแบบฟลูอิดไดซ์เบด (อัตราการให้อากาศ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที) พบว่าได้ความเข้มข้นกรดมะนาวสูงสุดเท่ากับ 0.73, 3.47 และ 2.65 กรัมต่อลิตรตามลำดับ ซึ่งน้อยกว่าการผลิตด้วยเซลล์อิสระในถังหมักขนาด 5 ลิตร (76.61 กรัมต่อลิตร) นอกจากนี้เมื่อตรึงไม่เสถียรตลอดระยะเวลาการผลิตแม้ว่าจะทำการผลิตในถังหมักแบบฟลูอิดไดซ์เบด ดังนั้นจึงทำการเลี้ยงเซลล์อิสระแบบ perfusion ในถังหมักที่มี spinfilter พบว่าได้ความเข้มข้นกรดมะนาวสูงสุดเท่ากับ 73.79 กรัมต่อลิตร ในระหว่างการหมักน้ำหมักจะถูกกรองและผ่านเข้าคอลัมน์แลกเปลี่ยนประจุลบที่บรรจุด้วยเรซิน Dowex Marathon WBA แล้วเวียนกลับเข้าถังหมัก โดยที่เรซินแสดงลักษณะของการดูดซับกรดมะนาวที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 5.00 แบบ Langmuir มีค่าความสามารถในการดูดซับกรดมะนาวสูงสุดออกจากน้ำหมัก (q_m) และค่าคงที่ของการดูดซับ (K) เท่ากับ 0.38 กรัมกรดมะนาวต่อกรัมเรซิน และ 31.42 กรัมต่อลิตรตามลำดับ การแยกกรดมะนาวระหว่างการหมักด้วยเรซินแลกเปลี่ยนไอออนในถังหมักที่มี spinfilter พบว่าให้ผลผลิตทั้งหมดเพิ่มขึ้นจาก 81.17 กรัมได้เป็น 90.50 กรัม และอัตราการผลิตเท่ากับ 0.602 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สาขาวิชา.....เทคโนโลยีชีวภาพ..... ลายมือชื่อนิติ..... อุคมพร มณีรัตน์
ปีการศึกษา.....2548..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา..... สุรพงศ์ นวังคสัตถุศาสน์
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม..... นวังคสัตถุศาสน์
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม..... กิตตินันท์ โดเลียง

4572594923 : MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEY WORD : CITRIC ACID/ ION EXCHANGE / EXTRACTIVE FERMENTATION

UDOMPORN MANEERAT : CITRIC ACID PRODUCTION BY YEAST WITH
IN-SITU PRODUCT SEPARATION BY ION-EXCHANGE RESIN. THESIS
ADVISOR : ASST. PROF. SURAPONG NAVANKASATTUSAS, Ph.D. THESIS
CO-ADVISOR : VASANA TOLIENG, KITTINAN KOMOLPIS, Ph.D. 131 pp.
ISBN 974-53-2973-8

The purpose of this research was to improve citric acid production by yeast *Candida oleophila* NNU-62. Extractive fermentation using ion exchange resin was investigated to increase yield and productivity. Yeast cells at 8.15 g dry weight/l in 75 ml was immobilized in 75 ml of 4% (w/v) alginate solution. Citric acid production by immobilized yeast was compared in three conditions namely, those in a 5L fermentor with agitation rate at 50 rpm, without agitation (aeration rate at 1.5 vvm) and in a fluidized bed reactor (aeration rate at 1.0 vvm). The results showed that the maximal citric acid concentration were 0.73, 3.47 and 2.65 g/l, respectively. However these values were less than that obtained from the production using free cell with agitation in a 5L fermentor (76.61 g/l). Furthermore, the immobilized bead was not stable throughout the production period even in the fluidized bed reactor. Therefore, perfusion cultivation of free cell in a fermentor with spinfilter was used, resulting in the citric acid concentration of 73.79 g/l. During the citric acid production, the fermentation broth was filtered and pumped to anion exchange column of Dowex Marathon WBA, then recycled back to the fermentor. The adsorption isotherm of citric acid at pH 5.00 was Langmuir type with the maximum adsorption capacity (q_m) and adsorption constant (K) at 0.38 g citric acid/g resin and 31.42 g/l, respectively. Using extractive fermentation in a fermentor installed with spinfilter, the total yield was increased from 81.17 g to 90.50 g with the productivity of 0.602 g/l h.

Field of study.....Biotechnology.....Student's signature.....*Udomporn*.....

Academic year.....2005.....Advisor's signature.....*Surapong Navankasattusas*.....

Co-advisor's signature.....*S. Tolieng*.....

Co-advisor's signature.....*K. Kittinan Komolpis*.....

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาระดับปริญญาโทและวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จด้วยความสมบูรณ์ โดยได้รับความกรุณาจากผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุรพงษ์ นวังคสัตถุศาสน์ อาจารย์วาสนา โตเลี้ยง และ ดร.กิตตินันท์ โกมลภิส ที่กรุณาได้รับเป็นอาจารย์ที่ปรึกษา และอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ตลอดจนให้คำแนะนำในการทำวิจัยและแนะแนวทางการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.อมร เพชรสม และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พลกฤษณ์ แสงวนิช ที่กรุณาได้รับเป็นประธานและกรรมการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิตในครั้งนี้

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.นลิน นิลอุบล และรองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพณิชการ ที่กรุณาให้คำแนะนำในการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณนักวิจัยในสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้คำแนะนำและกำลังใจในการทำวิจัย

ขอขอบคุณ บุคลากรทุกท่านในสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือในการสั่งซื้อ จัดหาอุปกรณ์และสารเคมีรวมทั้งช่วยเหลือซ่อมบำรุงอุปกรณ์ในการทำวิจัย

ขอขอบคุณเพื่อนๆ พี่ๆ น้องๆ เทคโนโลยีชีวภาพสำหรับกำลังใจ และขอขอบคุณเพื่อนๆ พี่ๆ น้องๆ ที่สถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับความช่วยเหลือและกำลังใจ

ขอขอบคุณอภิชาติ ศิริรัตน์ สำหรับกำลังใจที่มีให้เสมอมา

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และครอบครัวที่ให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจสำคัญในการทำวิทยานิพนธ์จนสำเร็จสมบูรณ์

ศาสตราจารย์ ดร.สุรพงษ์ นวังคสัตถุศาสน์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฉ
สารบัญรูป.....	ฅ
บทที่	
1	บทนำ..... 1
	1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา..... 1
	1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย..... 2
	1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ..... 2
	1.4 ขอบเขตและวิธีดำเนินการวิจัย..... 2
2	เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 4
	2.1 ประวัติความเป็นมา..... 4
	2.2 สมบัติของกรดมะนาว..... 4
	2.3 ประโยชน์ของกรดมะนาว..... 5
	2.4 การผลิตกรดมะนาวด้วยยีสต์..... 6
	2.5 ชีวเคมีของการผลิตกรดมะนาวด้วยยีสต์..... 6
	2.6 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดมะนาวด้วยยีสต์..... 8
	2.7 วิธีการตรึงเซลล์จุลินทรีย์..... 10
	2.8 การผลิตกรดมะนาวด้วยยีสต์ตรึง..... 12
	2.9 การหมักด้วยระบบ perfusion ใช้ร่วมกับ spinfilter..... 13
	2.10 การแยกกรดมะนาว..... 13
	2.11 การแลกเปลี่ยนไอออน (Ion exchange)..... 15
	2.12 การประยุกต์ใช้การแลกเปลี่ยนไอออนในกระบวนการหมัก..... 19
3	วิธีการทดลอง..... 21
	3.1 อุปกรณ์และสารเคมี..... 21
	3.2 เชื้อจุลินทรีย์..... 23
	3.3 การเก็บรักษาเชื้อ..... 23

บทที่	หน้า
3.4 การเลี้ยงเชื้อและการผลิตกรดมะนาว.....	23
3.5 การตรึงเซลล์ <i>C. oleophila</i> NNU-62 เพื่อผลิตกรดมะนาว.....	24
3.6 การศึกษาสมบัติของเรซินแลกเปลี่ยนไอออนที่จะนำไปใช้ในการแยก กรดมะนาว.....	25
3.7 การหาภาวะที่เหมาะสมในการแยกกรดมะนาวด้วยคอลัมน์แลกเปลี่ยนไอออน....	26
3.8 การผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 2 ลิตรด้วยระบบ perfusion โดยใช้ spinfilter ควบคุมกับการแยกด้วยคอลัมน์แลกเปลี่ยนไอออน.....	28
3.9 วิธีการวิเคราะห์.....	30
4 ผลการทดลองและอภิปรายผล.....	30
4.1 รูปแบบการเจริญของเชื้อ <i>C. oleophila</i> NNU-62 ในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ ในขวดเขย่า.....	30
4.2 รูปแบบการเจริญของเชื้อ <i>C. oleophila</i> NNU-62 ในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ ในถังหมักขนาด 5 ลิตร.....	31
4.3 การผลิตกรดมะนาวด้วยเชื้อ <i>C. oleophila</i> NNU-62 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร.....	32
4.4 การตรึงเซลล์ <i>C. oleophila</i> NNU-62 เพื่อผลิตกรดมะนาวในถังหมัก ขนาด 5 ลิตร.....	35
4.5 การตรึงเซลล์ <i>C. oleophila</i> NNU-62 เพื่อผลิตกรดมะนาวในถังหมัก ขนาด 5 ลิตรโดยไม่กวนผสม.....	39
4.6 การตรึงเซลล์ <i>C. oleophila</i> NNU-62 เพื่อผลิตกรดมะนาวในถังหมักแบบ ฟลูอิดไดซ์เบด.....	40
4.7 การผลิตกรดมะนาวด้วยเชื้อ <i>C. oleophila</i> NNU-62 ในระดับถังหมักขนาด 2 ลิตร ระบบ perfusion.....	47
4.8 ศึกษาสมบัติของเรซินแลกเปลี่ยนไอออน.....	51
4.8.1 เวลาที่สมดุลของเรซินในการดูดซับกรดมะนาว.....	51
4.8.2 เวลาที่สมดุลของเรซิน Dowex Marathon WBA ในการดูดซับ กรดมะนาว.....	54
4.8.3 ศึกษา ion exchange isotherm.....	55
4.9 ภาวะที่เหมาะสมสำหรับการดูดซับกรดมะนาวของคอลัมน์แลกเปลี่ยนไอออน.....	59
4.9.1 ขั้นตอนการดูดซับ.....	59
4.9.1.1 Breakthrough curve.....	59

บทที่	หน้า
4.10 ภาวะที่เหมาะสมสำหรับการชะกรดมะนาวออกจากคอลัมน์แลกเปลี่ยนไอออน.....	62
4.10.1 เวลาที่สมดุลของการชะกรดมะนาวออกจากเรซิน.....	62
4.10.1.1 สารละลายกรดมะนาวเกรดทางการค้าที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 5.00.....	63
4.10.1.2 น้ำหมักกรดมะนาวที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 5.00.....	64
4.10.2 อัตราการไหลที่เหมาะสมของสารละลายตัวชะ.....	65
4.10.2.1 อัตราการไหลที่เหมาะสมในการชะกรดมะนาวในสารละลายกรดมะนาวเกรดทางการค้าที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 5.00.....	66
4.10.2.2 อัตราการไหลที่เหมาะสมในการชะกรดมะนาวในน้ำหมักกรดมะนาวที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 5.30.....	68
4.11 การแยกกรดมะนาวออกจากน้ำหมักด้วยคอลัมน์แลกเปลี่ยนไอออนควบคู่การหมักในระดับถังหมักขนาด 2 ลิตร.....	69
4.11.1 ควบคุมค่าความเป็นกรดต่างด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้นร้อยละ 40 (น้ำหนักต่อปริมาตร) หยุดควบคุมค่าความเป็นกรดต่างตั้งแต่ชั่วโมง 24.....	70
4.11.2 ควบคุมค่าความเป็นกรดต่างด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้นร้อยละ 40 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ทุกๆ 12 ชั่วโมงจนสิ้นสุดการทดลอง.....	75
4.11.3 ควบคุมค่าความเป็นกรดต่างด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้นร้อยละ 40 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 จนสิ้นสุดการทดลอง.....	79
4.11.4 ควบคุมค่าความเป็นกรดต่างด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้นร้อยละ 40 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 จนสิ้นสุดการทดลอง และภายในคอลัมน์แลกเปลี่ยนไอออนลบบรรจุด้วยอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาว....	83
4.11.5 เปรียบเทียบการผลิตกรดมะนาวด้วยยีสต์ <i>C. oleophila</i> NNU-62 ด้วยการหมักแบบไม่แยกระหว่างหมักและแบบ extractive fermentation ในถังหมักขนาด 2 ลิตร.....	88
5 สรุปผลการทดลอง.....	90

บทที่	หน้า
รายการอ้างอิง.....	92
ภาคผนวก.....	97
ภาคผนวก ก.....	98
ภาคผนวก ข.....	100
ภาคผนวก ค.....	101
ภาคผนวก ง.....	104
ภาคผนวก จ.....	106
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	131



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า	
4.1	ค่าทางจลนพลศาสตร์ของการผลิตกรดมะนาวด้วยยีสต์อิสระ <i>C. oleophila</i> NNU-62 ในถังหมักขนาด 5 ลิตรกับยีสต์ตรึงในถังหมักขนาด 5 ลิตรและถังหมักแบบฟลูอิดไดซ์เบด.....	46
4.2	เปรียบเทียบค่าจลนพลศาสตร์ของการหมักยีสต์ <i>C. oleophila</i> NNU-62 เพื่อผลิตกรดมะนาวแบบไม่แยกระหว่างหมักและแบบ extractive fermentation.....	89
จ.1	น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าอัตราการเจริญจำเพาะของเชื้อ <i>C. oleophila</i> NNU-62 ในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อในระดับขวดเขย่าที่ช่วงเวลาเพาะเลี้ยงต่างๆ.....	106
จ.2	น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าอัตราการเจริญจำเพาะของเชื้อ <i>C. oleophila</i> NNU-62 ในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ ในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่ช่วงเวลาเพาะเลี้ยงต่างๆ.....	106
จ.3	ปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิติริก น้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำตาลกลูโคสที่เหลือ ค่า productivity ค่า Yp/s Yx/s และ Yp/x ที่ระยะเวลาต่างๆ ของการหมักเมื่อเลี้ยงเชื้อ <i>C. oleophila</i> NNU-62 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 5 ลิตร.....	107
จ.4	ปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิติริก น้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำตาลกลูโคสที่เหลือ ค่า productivity ค่า Yp/s Yx/s และ Yp/x ที่ระยะเวลาต่างๆ ของการหมักเมื่อเลี้ยงเซลล์ตรึง <i>C. oleophila</i> NNU-62 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่อัตราการกวน 50 รอบต่อนาที.....	108
จ.5	ปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิติริก น้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำตาลกลูโคสที่เหลือ ค่า productivity ค่า Yp/s Yx/s และ Yp/x ที่ระยะเวลาต่างๆ ของการหมักเมื่อเลี้ยงเซลล์ตรึง <i>C. oleophila</i> NNU-62 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยไม่กวนผสม.....	109
จ.6	ปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิติริก น้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำตาลกลูโคสที่เหลือ ค่า productivity ค่า Yp/s Yx/s และ Yp/x ที่ระยะเวลาต่างๆ ของการหมักเมื่อเลี้ยงเซลล์ตรึง <i>C. oleophila</i> NNU-62 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวในถังหมักแบบฟลูอิดไดซ์เบด.....	110
จ.7	ปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิติริก น้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำตาลกลูโคสที่เหลือ ค่า productivity ค่า Yp/s Yx/s และ Yp/x ที่ระยะเวลาต่างๆ ของการหมัก เมื่อเลี้ยงเซลล์ <i>C. oleophila</i> NNU-62 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 2 ลิตร.....	111

ตารางที่	หน้า
จ.8 ปริมาณกรดมะนาวที่ถูกดูดซับบนเรซินDowex 1x4-400 ที่ค่าความเป็นกรดต่าง ต่างๆ.....	112
จ.9 ปริมาณกรดมะนาวที่ถูกดูดซับบนเรซิน Dowex Marathon W BA ที่ค่าความ เป็นกรดต่างๆ	112
จ.10 ปริมาณกรดมะนาวที่ถูกดูดซับบนเรซิน Amberlite XAD-7 ที่ค่าความเป็นกรด ต่างๆ.....	112
จ.11 ปริมาณกรดมะนาวที่ถูกดูดซับสูงสุดบนเรซินทั้ง 3 ชนิด.....	113
จ.12 ปริมาณกรดมะนาวที่ไม่ถูกดูดซับบนเรซิน Dowex Marathon WBA ที่เวลา ในการดูดซับต่างๆ.....	113
จ.13 Ion exchange isotherm ของเรซิน Dowex Marathon WBA ในการดูดซับสาร ละลายกรดมะนาวเกรดทางการค้าที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 5.00.....	114
จ.14 Ion exchange isotherm ของเรซิน Dowex Marathon WBA ในการดูดซับกรด มะนาวในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 5.00.....	114
จ.15 ความเข้มข้นของกรดมะนาวในสารละลายส่วนต่างๆ ที่ผ่านออกจากคอลัมน์ ค่า C_t/C_0 ปริมาณกรดมะนาวที่ผ่านเข้าคอลัมน์ และที่ถูกดูดซับ เมื่อผ่านสาร ละลายกรดมะนาวเกรดทางการค้า ที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 5.00 เข้าคอลัมน์ ด้วยอัตราการไหล 3.75 มิลลิลิตรต่อชั่วโมงต่อมิลลิลิตรของปริมาตรว่างระหว่าง เรซิน.....	115
จ.16 ความเข้มข้นของกรดมะนาวในสารละลายส่วนต่างๆ ที่ผ่านออกจากคอลัมน์ ค่า C_t/C_0 ปริมาณกรดมะนาวที่ผ่านเข้าคอลัมน์ และที่ถูกดูดซับ เมื่อผ่านสาร ละลายกรดมะนาวเกรดทางการค้า ที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 5.00 เข้าคอลัมน์ ด้วยอัตราการไหล 7.5 มิลลิลิตรต่อชั่วโมงต่อมิลลิลิตรของปริมาตรว่างระหว่าง เรซิน.....	116
จ.17 ความเข้มข้นของกรดมะนาวในสารละลายส่วนต่างๆ ที่ผ่านออกจากคอลัมน์ ค่า C_t/C_0 ปริมาณกรดมะนาวที่ผ่านเข้าคอลัมน์ และที่ถูกดูดซับ เมื่อผ่านน้ำหมัก กรดมะนาวที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 5.30 เข้าคอลัมน์ด้วยอัตราการไหล 3.75 มิลลิลิตรต่อชั่วโมงต่อมิลลิลิตรของปริมาตรว่างระหว่างเรซิน.....	117
จ.18 ความเข้มข้นของกรดมะนาวในสารละลายส่วนต่างๆ ที่ผ่านออกจากคอลัมน์ ค่า C_t/C_0 ปริมาณกรดมะนาวที่ผ่านเข้าคอลัมน์ และที่ถูกดูดซับ เมื่อผ่านน้ำหมัก กรดมะนาวเกรดที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 5.30 เข้าคอลัมน์ด้วยอัตรา การไหล 7.5 มิลลิลิตรต่อชั่วโมงต่อมิลลิลิตรของปริมาตรว่างระหว่างเรซิน.....	118

ตารางที่	หน้า
จ.19 ปริมาณกรดมะนาวในสารละลายกรดมะนาวเกรดทางการค้าที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 5.00 ที่ถูกชะออกจากเรซินด้วยสารละลายกรดซัลฟูริกที่ความเข้มข้นต่างๆที่เวลาในการชะต่างๆกัน.....	119
จ.20 ปริมาณกรดมะนาวที่ถูกชะและเปอร์เซ็นต์การชะกรดมะนาวในสารละลายกรดมะนาวเกรดทางการค้าที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 5.00 ออกจากเรซินด้วยสารละลายกรดซัลฟูริกที่ความเข้มข้นต่างๆ	119
จ.21 ปริมาณกรดมะนาวในน้ำหมักกรดมะนาวที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 5.30 ที่ถูกชะออกจากเรซินด้วยสารละลายกรดซัลฟูริกที่ความเข้มข้นต่างๆที่เวลาในการชะต่างๆกัน.....	120
จ.22 เปอร์เซ็นต์การชะกรดมะนาวในน้ำหมักกรดมะนาวที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 5.30 ออกจากเรซินด้วยสารละลายกรดซัลฟูริกที่ความเข้มข้นต่างๆ	120
จ.23 ปริมาณกรดมะนาวในสารละลายกรดมะนาวเกรดทางการค้าที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 5.30 ที่ถูกชะออกจากเรซิน ด้วยสารละลายกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 1.0 โมลาร์ ที่เวลาในการชะต่างๆ กัน.....	121
จ.24 ปริมาณกรดมะนาวในน้ำหมักกรดมะนาวที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 5.30 ที่ถูกชะออกจากเรซินด้วยสารละลายกรดซัลฟูริกที่ความเข้มข้น1.5 โมลาร์ ที่เวลาในการชะต่างๆกัน.....	121
จ.25 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดมะนาว กรดไอ โซซิดริก กลูโคสที่เหลือ ค่าความเป็นกรดต่าง และเปอร์เซ็นต์ออกซิเจนที่ละลายน้ำได้ ของการหมักที่เวลาต่างๆ เมื่อเลี้ยงเชื้อ <i>C. oleophila</i> NNU-62 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 2 ลิตร รูปแบบการผลิตแบบ extractive fermentation หยุดควบคุมค่าความเป็นกรดต่างตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24.....	122
จ.26 ปริมาณและความเข้มข้นของกรดมะนาวในลำดับส่วนต่างๆ ของสารละลายที่ได้จากการชะคอลัมน์แลกเปลี่ยนไอออนด้วยสารละลายกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 1.5 โมลาร์ ของการหมักแบบ extractive fermentation ที่หยุดควบคุมค่าความเป็นกรดต่างตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24.....	123
จ.27 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดมะนาว กรดไอ โซซิดริก กลูโคสที่เหลือ ค่าความเป็นกรดต่าง และเปอร์เซ็นต์ออกซิเจนที่ละลายน้ำได้ ของการหมักที่เวลาต่างๆ เมื่อเลี้ยงเชื้อ <i>C. oleophila</i> NNU-62 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 2 ลิตร รูปแบบการผลิตแบบ extractive fermentation ควบคุมค่าความเป็นกรดต่างทุกๆ 12 ชั่วโมง.....	124

ตารางที่	หน้า	
จ.28	ปริมาณและความเข้มข้นของกรดมะนาวในลำดับส่วนต่างๆ ของสารละลายที่ได้จากการชะคอลลัมน์แลกเปลี่ยนไอออนด้วยสารละลายกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 1.5 โมลาร์ จากการหมักแบบ extractive fermentation ที่ทำการปรับค่าความเป็นกรดต่าง ๆ 12 ชั่วโมง.....	125
จ.29	น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซिटริก กลูโคสที่เหลือ ค่าความเป็นกรดต่าง และเปอร์เซ็นต์ออกซิเจนที่ละลายน้ำได้ ของการหมักที่เวลาต่างๆ เมื่อเลี้ยงเชื้อ <i>C. oleophila</i> NNU-62 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 2 ลิตร รูปแบบการผลิตแบบ extractive fermentation ควบคุมค่าความเป็นกรดต่างตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 จนถึงสิ้นสุดการทดลอง.....	126
จ.30	ปริมาณและความเข้มข้นของกรดมะนาวในลำดับส่วนต่างๆ ของสารละลายที่ได้จากการชะคอลลัมน์แลกเปลี่ยนไอออนด้วยสารละลายกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 1.5 โมลาร์จากการหมักแบบ extractive fermentation ที่ทำการปรับค่าความเป็นกรดต่างตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 จนถึงสิ้นสุดการทดลอง.....	127
จ.31	น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิทริก กลูโคสที่เหลือ ค่าความเป็นกรดต่าง และเปอร์เซ็นต์ออกซิเจนที่ละลายน้ำได้ ของการหมักที่เวลาต่างๆ เมื่อเลี้ยงเชื้อ <i>C. oleophila</i> NNU-62 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 2 ลิตร รูปแบบการผลิตแบบ extractive fermentation ควบคุมค่าความเป็นกรดต่างตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 จนถึงสิ้นสุดการทดลอง แยกด้วยคอลลัมน์แลกเปลี่ยนไอออน 2 คอลลัมน์.....	128
จ.32	ปริมาณและความเข้มข้นของกรดมะนาวในลำดับส่วนต่างๆ ของสารละลายที่ได้จากการชะคอลลัมน์แลกเปลี่ยนไอออนคอลลัมน์ที่ 1 ด้วยสารละลายกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 1.5 โมลาร์ จากการหมักแบบ extractive fermentation ที่ทำการปรับค่าความเป็นกรดต่างตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 จนถึงสิ้นสุดการทดลอง	129
จ.33	ปริมาณและความเข้มข้นของกรดมะนาวในลำดับส่วนต่างๆ ของสารละลายที่ได้จากการชะคอลลัมน์แลกเปลี่ยนไอออนคอลลัมน์ที่ 2 ด้วยสารละลายกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 1.5 โมลาร์ จากการหมักแบบ extractive fermentation ที่ทำการปรับค่าความเป็นกรดต่างตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 จนถึงสิ้นสุดการทดลอง	130

สารบัญรูป

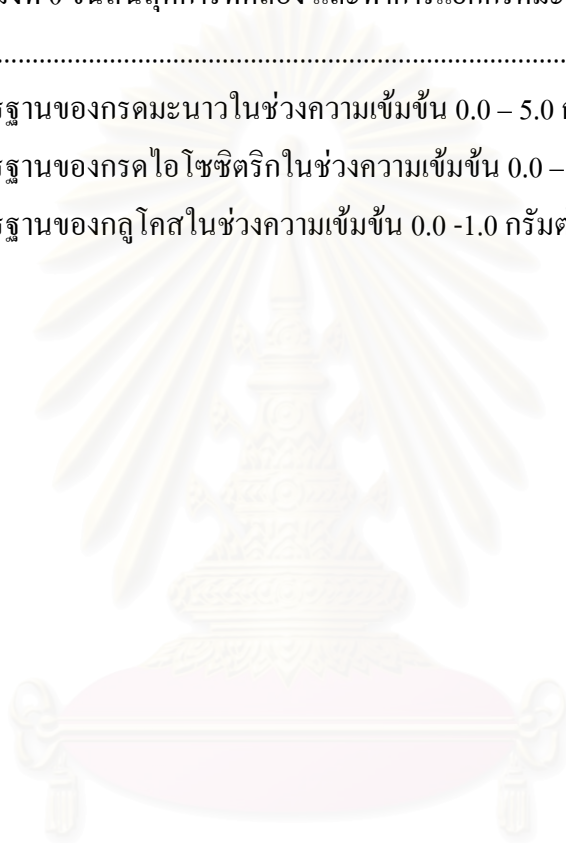
รูปที่		หน้า
2.1	โครงสร้างทางเคมีของกรดมะนาว.....	5
2.2	วิธีการผลิตกรดมะนาวโดยยีสต์ผ่านทางวัฏจักรเครปส์.....	7
2.3	Adsorption isotherm ทั้ง 3 ประเภท.....	16
2.4	ความเข้มข้นของตัวถูกละลายในการดูดซับในคอลัมน์ (a) ค่า c/c_0 ที่ตำแหน่ง และเวลาต่างๆ ของการดูดซับ (b) breakthrough curve ของสารละลาย.....	19
4.1	รูปแบบการเจริญของเชื้อ <i>C. oleophila</i> NNU-62 ในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อใน ขวดเขย่า.....	30
4.2	รูปแบบการเจริญของเชื้อ <i>C. oleophila</i> NNU-62 ในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อใน ถังหมักขนาด 5 ลิตร.....	31
4.3	น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดมะนาว ปริมาณกรดไอโซซิทริก และปริมาณกลูโคส ที่เหลือที่เวลาต่างๆ เมื่อเลี้ยงเชื้อ <i>C. oleophila</i> NNU-62 ในอาหารสำหรับผลิตกรด มะนาวในถังหมักขนาด 5 ลิตร.....	33
4.4	ค่า Y_p/s Y_x/s และ Y_p/x ที่เวลาต่างๆ เมื่อเลี้ยงเชื้อ <i>C. oleophila</i> NNU-62 ในอาหาร สำหรับผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 5 ลิตร.....	34
4.5	การเตรียมเซลล์ตรึงโดยวิธีกักขังบนแคลเซียมอัลจิเนต.....	35
4.6	ขนาดเซลล์ตรึงที่นำไปใช้ผลิตกรดมะนาว.....	35
4.7	การผลิตกรดมะนาวด้วยยีสต์ตรึงในถังหมักขนาด 5 ลิตร.....	35
4.8	น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดมะนาว ปริมาณกรดไอโซซิทริก และปริมาณกลูโคส ที่เหลือที่เวลาต่างๆ เมื่อเลี้ยงเซลล์ตรึง <i>C. oleophila</i> NNU-62 ในอาหารสำหรับผลิต กรดมะนาวในถังหมักขนาด 5 ลิตร อัตราการกวน 50 รอบต่อนาที.....	37
4.9	ค่า Y_p/s Y_x/s และ Y_p/x ที่เวลาต่างๆ เมื่อเลี้ยงเซลล์ตรึง <i>C. oleophila</i> NNU-62 ใน อาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 5 ลิตร อัตราการกวน 50 รอบต่อ นาที.....	38
4.10	น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดมะนาว ปริมาณกรดไอโซซิทริก และปริมาณกลูโคส ที่เหลือ ที่เวลาต่างๆ เมื่อเลี้ยงเซลล์ตรึง <i>C. oleophila</i> NNU-62 ในอาหารสำหรับผลิต กรดมะนาวในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยไม่กวนผสม.....	41
4.11	ค่า Y_p/s Y_x/s และ Y_p/x ที่เวลาต่างๆ เมื่อเลี้ยงเซลล์ตรึง <i>C. oleophila</i> NNU-62 ใน อาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยไม่กวนผสม.....	42
4.12	การตรึงเซลล์ <i>C. oleophila</i> NNU-62 เพื่อผลิตกรดมะนาวในถังหมักแบบ ฟลูอิดไดซ์เบด.....	43

รูปที่	หน้า
4.13	44
4.14	45
4.15	48
4.16	49
4.17	50
4.18	52
4.19	52
4.20	53
4.21	55
4.22	56
4.23	57
4.24	58
4.25	58
4.26	60

รูปที่	หน้า
4.27 Breakthrough curve ของการดูดซับกรดอะมิโนจากน้ำหมักกรดอะมิโนที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 5.30 ของคอลัมน์แลกเปลี่ยนไอออนที่อัตราการไหลต่างๆ.....	61
4.28 ปริมาณกรดอะมิโนในสารละลายกรดอะมิโนเกรดทางการค้าที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 5.00 ที่ถูกชะด้วยสารละลายกรดซัลฟูริกที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่เวลาในการชะต่างๆกัน.....	63
4.29 เเปอร์เซ็นต์การชะกรดอะมิโนในสารละลายกรดอะมิโนเกรดทางการค้าที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 5.00 ออกจากเรซินด้วยสารละลายกรดซัลฟูริกที่ความเข้มข้นต่างๆ.....	64
4.30 ปริมาณกรดอะมิโนในน้ำหมักกรดอะมิโนที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 5.3 ที่ถูกชะด้วยสารละลายกรดซัลฟูริกที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่เวลาในการชะต่างๆกัน.....	65
4.31 เเปอร์เซ็นต์การชะกรดอะมิโนในน้ำหมักกรดอะมิโนที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 5.30 ออกจากเรซินด้วยสารละลายกรดซัลฟูริกที่ความเข้มข้นต่างๆ.....	66
4.32 ปริมาณกรดอะมิโนในสารละลายกรดอะมิโนเกรดทางการค้าที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 5.00 ที่ถูกชะออกจากเรซินด้วยสารละลายกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 1.0 โมลาร์ ที่เวลาในการชะต่างๆ.....	67
4.33 ปริมาณกรดอะมิโนในน้ำหมักกรดอะมิโนที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 5.30 ที่ถูกชะออกจากเรซินด้วยสารละลายกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 1.5 โมลาร์ ที่เวลาในการชะต่างๆ.....	68
4.34 การผลิตกรดอะมิโนด้วยเชื้อ <i>C. oleophila</i> NNU-62 ในถังหมักขนาด 2 ลิตร รูปแบบการผลิตแบบ extractive fermentation.....	70
4.35 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดอะมิโน กรดไอโซซิติริก กลูโคสที่เหลือ ค่าความเป็นกรดต่าง และเปอร์เซ็นต์ออกซิเจนที่ละลายน้ำได้ ของการหมักที่เวลาต่างๆ เมื่อเลี้ยงเชื้อ <i>C. oleophila</i> NNU-62 ในถังหมักขนาด 2 ลิตร รูปแบบการผลิตแบบ extractive fermentation หยุดควบคุมค่าความเป็นกรดต่างตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24.....	71
4.36 ค่า Y_p/s , Y_x/s และ $Y_{p/x}$ ที่ระยะเวลาต่างๆ ของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ <i>C. oleophila</i> NNU-62 ในถังหมักขนาด 2 ลิตร รูปแบบการผลิตแบบ extractive fermentation หยุดควบคุมค่าความเป็นกรดต่างตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24.....	72
4.37 ปริมาณกรดอะมิโนที่ถูกชะด้วยสารละลายกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 1.5 โมลาร์ เมื่อทำการผลิตกรดอะมิโนแบบ extractive fermentation ที่ควบคุมค่าความเป็นกรดต่างด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 40	

รูปที่	หน้า
(น้ำหนักต่อปริมาตร) หยุดควบคุมค่าความเป็นกรดต่างตั้งแต่ชั่วโมง 24.....	74
4.38 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซชิตริก กลูโคสที่เหลือ ค่าความเป็นกรดต่าง และเปอร์เซ็นต์ออกซิเจนที่ละลายน้ำได้ ของการหมักที่เวลาต่างๆเมื่อเลี้ยงเชื้อ <i>C. oleophila</i> NNU-62 ในถังหมักขนาด 2 ลิตร รูปแบบการผลิตแบบ extractive fermentation ควบคุมค่าความเป็นกรดต่างทุกๆ 12 ชั่วโมง.....	76
4.39 ค่า Yp/s, Yx/s และ Yp/x ที่ระยะเวลาต่างๆ ของการหมักเมื่อเลี้ยงเชื้อ <i>C. oleophila</i> NNU-62 ในถังหมักขนาด 2 ลิตร รูปแบบการผลิตแบบ extractive fermentation ควบคุมค่าความเป็นกรดต่างทุกๆ 12 ชั่วโมง.....	77
4.40 ปริมาณกรดมะนาวที่ถูกชะด้วยสารละลายกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 1.5 โมลาร์ เมื่อทำการผลิตกรดมะนาวแบบ extractive fermentation ที่ควบคุมค่าความเป็นกรดต่างด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 40 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ทุกๆ 12 ชั่วโมง.....	79
4.41 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซชิตริก กลูโคสที่เหลือ ค่าความเป็นกรดต่างและเปอร์เซ็นต์ออกซิเจนที่ละลายน้ำได้ ของการหมักที่เวลาต่างๆ เมื่อเลี้ยงเชื้อ <i>C. oleophila</i> NNU-62 ในถังหมักขนาด 2 ลิตร รูปแบบการผลิตแบบ extractive fermentation ควบคุมค่าความเป็นกรดต่างตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 จนถึงสิ้นสุดการทดลอง.....	81
4.42 ค่า Yp/s, Yx/s และ Yp/x ที่ระยะเวลาต่างๆ ของการหมักเมื่อเลี้ยงเชื้อ <i>C. oleophila</i> NNU-62 ในถังหมักขนาด 2 ลิตร รูปแบบการผลิตแบบ extractive fermentation ควบคุมค่าความเป็นกรดต่างตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 จนถึงสิ้นสุดการทดลอง.....	82
4.43 ปริมาณกรดมะนาวที่ถูกชะด้วยสารละลายกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 1.5 โมลาร์ เมื่อทำการผลิตกรดมะนาวแบบ extractive fermentation ที่ควบคุมค่าความเป็นกรดต่างด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 40 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 จนถึงสิ้นสุดการทดลอง.....	83
4.44 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซชิตริก กลูโคสที่เหลือ ค่าความเป็นกรดต่างและเปอร์เซ็นต์ออกซิเจนที่ละลายน้ำได้ ของการหมักที่เวลาต่างๆ เมื่อเลี้ยงเชื้อ <i>C. oleophila</i> NNU-62 ในถังหมักขนาด 2 ลิตร รูปแบบการผลิตแบบ extractive fermentation ควบคุมค่าความเป็นกรดต่าง ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 จนถึงสิ้นสุดการทดลอง แยกด้วยคอลัมน์แลกเปลี่ยนไอออน 2 คอลัมน์.....	85
4.45 ค่า Yp/s, Yx/s และ Yp/x ที่ระยะเวลาต่างๆ ของการหมักเมื่อเลี้ยงเชื้อ <i>C. oleophila</i> NNU-62 ในถังหมักขนาด 2 ลิตร รูปแบบการผลิตแบบ extractive fermentation	

รูปที่	หน้า
ควบคุมค่าความเป็นกรดต่างตั้งแต่ช่วงที่ 0 จนถึงสูงสุดการทดลอง แยกด้วยคอลัมน์ แลกเปลี่ยนไอออน 2 คอลัมน์.....	86
4.46 ปริมาณกรดมะนาวที่ถูกระด้วยสารละลายกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 1.5 โมลาร์ เมื่อทำการผลิตกรดมะนาวแบบ extractive fermentation ที่ควบคุมค่าความเป็นกรด ต่างด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 40 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ตั้งแต่ช่วงที่ 0 จนถึงสูงสุดการทดลอง และทำการแยกกรดมะนาวด้วยคอลัมน์ 2 คอลัมน์.....	87
ค.1 กราฟมาตรฐานของกรดมะนาวในช่วงความเข้มข้น 0.0 – 5.0 กรัมต่อลิตร.....	101
ค.2 กราฟมาตรฐานของกรดไอโซชิตริกในช่วงความเข้มข้น 0.0 – 1.0 กรัมต่อลิตร.....	102
ค.3 กราฟมาตรฐานของกลูโคสในช่วงความเข้มข้น 0.0 -1.0 กรัมต่อลิตร.....	103



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

กรดมะนาว (citric acid) เป็นกรดอินทรีย์สำคัญชนิดหนึ่ง เป็นสารตัวกลางในวัฏจักรเครปส์ (Krebs cycle) พบทั่วไปทั้งในพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ กรดมะนาวเป็นสารที่มีรสเปรี้ยว มีความเป็นพิษต่ำและความสามารถในการละลายสูง จึงมีการนำไปใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น อุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม เกษษกรรม และเครื่องสำอาง เป็นต้น (Milsom และ Meers, 1985) ปัจจุบันทั่วโลกมีความต้องการใช้เพิ่มสูงขึ้นและมีปริมาณการผลิตต่อปีประมาณ 880,000 ตัน (Venter และคณะ, 2004)

กรดมะนาวผลิตได้ด้วยจุลินทรีย์ โดยเฉพาะเชื้อรา *Aspergillus niger* ซึ่งสามารถผลิตกรดมะนาวได้ในอาหารที่มีน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนที่ค่าความเป็นกรดต่ำ การผลิตในระดับอุตสาหกรรมผลิตโดยการหมักบนอาหารแข็ง (solid state process) บนผิวหน้าอาหาร (surface process) และในอาหารเหลว (submerged process) (Milsom และ Meers, 1985) นอกจากนี้มียีสต์หลายสายพันธุ์ โดยเฉพาะ *Candida sp.* สามารถผลิตกรดมะนาวได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ค่าความเป็นกรดต่ำค่อนข้างเป็นกลาง โดยยีสต์สามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้หลายชนิด เช่น กลูโคส ไฮโดรคาร์บอน และกากน้ำตาล เป็นต้น (Kapoor และคณะ, 1983) ข้อดีของการผลิตกรดมะนาวด้วยยีสต์ คือ ยีสต์มีอัตราการเจริญเร็วจึงใช้เวลาในการหมักสั้นและสามารถพัฒนากระบวนการหมักเป็นแบบต่อเนื่องได้สะดวกกว่าการผลิตด้วยเชื้อรา (Marison, 1988) ดังนั้นเพื่อเป็นการพัฒนากระบวนการผลิตกรดมะนาวจึงสนใจที่จะนำยีสต์มาผลิตร่วมกับวิธีการอื่น เช่น การผลิตกรดมะนาวด้วยยีสต์ครึ่ง (Kautola และคณะ, 1991) ซึ่งช่วยลดขั้นตอนการเตรียมเซลล์ปริมาณมาก เซลล์ครึ่งสามารถนำมาใช้ซ้ำและนำมาใช้ในการผลิตแบบต่อเนื่องอีกทั้งช่วยให้การแยกผลผลิตได้สะดวกขึ้น (Bódalo และคณะ, 1995)

การผลิตกรดมะนาวด้วยยีสต์ต้องควบคุมภาวะในการหมักให้เหมาะสมต่อการเจริญเพราะเมื่อมีการสะสมกรดมะนาวในอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มขึ้นจะทำให้ค่าความเป็นกรดต่ำของอาหารเลี้ยงเชื้อต่ำลง และมีผลยับยั้งการเจริญของยีสต์ทำให้การผลิตกรดมะนาวลดลง (Moresi และคณะ, 1980) ดังนั้นจึงต้องเติมสารบางอย่างลงไปเพื่อควบคุมความเป็นกรดต่ำ โดยสารที่นิยมใช้ เช่น แคลเซียมคาร์บอเนต แคลเซียมไฮดรอกไซด์ (Kautola และคณะ, 1991) และโซเดียมไฮดรอกไซด์ (Tisnadajaja และคณะ, 1996) เป็นต้น แต่สารเหล่านี้มีผลกระทบต่อการทำงานของยีสต์และการ

แยกกรดมะนาว วิธีที่สามารถนำมาลดปัญหานี้ คือการแยกผลิตภัณฑ์ควบคู่การหมัก ซึ่งได้มีการนำไปใช้ศึกษาการผลิตกรดแลกติก (Ye และคณะ, 1996) และการผลิตเม็ดสี (Kim และคณะ, 1999) พบว่าช่วยลดปฏิกิริยการยับยั้งจากการสะสมของผลผลิต ได้ผลผลิตเพิ่มขึ้น ลดของเหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตและนำมาใช้ควบคู่กับการผลิตแบบต่อเนื่องได้ และมีรายงานการศึกษาการผลิตกรดมะนาวด้วยเชื้อราและแยกกรดมะนาวระหว่างการหมักพบว่า ได้ผลผลิตเพิ่มขึ้นและลดเวลาการหมัก (Jianlong และคณะ, 2000) นอกจากนี้ยังสามารถเพิ่มผลผลิตได้โดยการเลี้ยงเซลล์ในระบบ perfusion ใช้ร่วมกับ spinfiler ซึ่งถูกนำไปใช้ในการผลิตโมโนโคลนอลแบบต่อเนื่อง โดยสามารถแยกเซลล์และอนุภาคขนาดเล็กออกจากน้ำหมักระหว่างการหมักผ่าน spinfiler โดยที่เซลล์ไม่หลุดออกจากระบบ พบว่าได้อัตราการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะเพิ่มขึ้น (Gautam และ Carole, 1995)

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงทำการศึกษาการผลิตกรดมะนาวโดยยีสต์ควบคู่กับแยกกรดมะนาวออกจากน้ำหมักด้วยเรซินแลกเปลี่ยนไอออนเพื่อให้ได้ข้อมูลที่จะนำไปใช้ในการพัฒนากระบวนการผลิตกรดมะนาวในระดับขยายส่วนต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

- 1.2.1 ศึกษาการผลิตกรดมะนาวด้วยยีสต์จริง
- 1.2.2 ศึกษาการผลิตกรดมะนาวด้วยยีสต์อิสระในระบบ perfusion
- 1.2.3 ศึกษาการผลิตกรดมะนาวด้วยยีสต์ควบคู่กับการแยกกรดมะนาวด้วยเรซินแลกเปลี่ยนไอออน

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถนำวิธีการแยกผลิตภัณฑ์มาใช้ควบคู่ในกระบวนการผลิตกรดมะนาวด้วยยีสต์ *Candida oleophila* NNU-62 เพื่อเพิ่มผลผลิตให้สูงขึ้นในระดับห้องปฏิบัติการและเป็นแนวทางสำหรับการผลิตกรดมะนาวในระดับขยายส่วนต่อไป

1.4 ขอบเขตและวิธีดำเนินการวิจัย

- 1.4.1 คำนวณและรวบรวมข้อมูล
- 1.4.2 ศึกษาการผลิตกรดมะนาวด้วยยีสต์อิสระในถังหมักขนาด 5 ลิตร
- 1.4.3 ศึกษาการผลิตกรดมะนาวด้วยยีสต์จริงด้วยวิธีกักขังในแคลเซียมอัลจินเตทังในถังหมักขนาด 5 ลิตรและถังหมักแบบฟลูอิดไคซ์เบด แล้วเปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้

1.4.4 ศึกษาการผลิตกรดมะนาวด้วยยีสต์อิสระในถังหมักขนาด 2 ลิตรในระบบ perfusion ใช้ร่วมกับ spinfilter แล้วเปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้กับการผลิตด้วยยีสต์อิสระในถังหมักขนาด 2 ลิตรและ 5 ลิตร โดยไม่ใช้ spinfilter

1.4.5 วิเคราะห์ค่าต่างๆ ดังนี้

1.4.5.1 น้ำหนักเซลล์แห้ง

1.4.5.2 ปริมาณกรดมะนาวโดยใช้เครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิกวิด

โครมาโทกราฟี (HPLC)

1.4.5.3 ปริมาณกลูโคสที่เหลือ โดยวิธี Bernfeld (Bernfeld, 1955)

1.4.6 ศึกษาการแยกกรดมะนาวออกจากน้ำหมักโดยเรซินแลกเปลี่ยนไอออน

1.4.6.1 ศึกษาเวลาที่สมดุลของเรซิน

เตรียมเรซิน 3 ชนิด ได้แก่ เรซินแลกเปลี่ยนไอออนลบชนิดแรง (Dowex 1x4-400) เรซินแลกเปลี่ยนไอออนลบชนิดอ่อน (Dowex Marathon WBA) และเรซินแบบไม่มีประจุ (Amberlite XAD-7) เปรียบเทียบเวลาที่สมดุลของเรซินในการดูดซับกรดมะนาวกับปริมาณกรดมะนาวที่ถูกดูดซับบนเรซินแต่ละชนิด เลือกเรซินที่สามารถดูดซับกรดมะนาวได้มากที่สุดที่เวลาสมดุล นำเรซินที่คัดเลือกมาใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

1.4.6.2 ศึกษารูปแบบ ion exchange isotherm การดูดซับกรดมะนาวของเรซิน

1.4.6.3 หากภาวะที่เหมาะสมในการแยกกรดมะนาวจากน้ำหมักด้วยคอลัมน์แลกเปลี่ยนไอออน ดังนี้

1.4.6.3.1 ขั้นตอนการดูดซับกรดมะนาว ศึกษา Breakthrough curve และแปรอัตราการไหลของน้ำหมัก

1.4.6.3.2 ขั้นตอนการชะด้วยกรดซัลฟูริก แปรความเข้มข้นของกรดซัลฟูริกในการชะ

1.4.7 ศึกษาการผลิตกรดมะนาวด้วยยีสต์ควบคู่การแยกด้วยเรซินแลกเปลี่ยนไอออน โดยเลี้ยงเซลล์ในถังหมักขนาด 2 ลิตร ระบบ perfusion ใช้ร่วมกับ spinfilter ทำการแยกกรดมะนาวระหว่างหมักด้วยคอลัมน์แลกเปลี่ยนไอออน โดยผ่านน้ำหมักเข้าคอลัมน์แลกเปลี่ยนไอออนแล้วเวียนกลับเข้าไปยังถังหมัก

1.4.8 วิเคราะห์ข้อมูล และทำการทดลองเพิ่มเติมเพื่อเสริมในส่วนที่จำเป็น

1.4.9 สรุปผลการทดลองและเขียนผลงานวิจัย

บทที่ 2

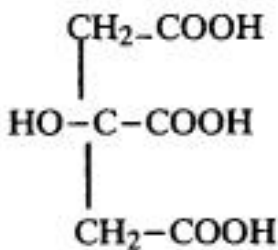
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ประวัติความเป็นมา

กรดมะนาว (citric acid) หรือกรด 2-ไฮดรอกซี-1,2,3-โพรเพนไตรคาร์บอกซิลิก เป็นกรดอินทรีย์สำคัญชนิดหนึ่ง เป็นสารตัวกลางในวัฏจักรเครปส์ (Krebs cycle) พบทั่วไปทั้งในพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ พบมากในพืชตระกูลส้ม เช่น มะนาว ส้ม องุ่น สับปะรด เป็นต้น (Milsom และ Meers, 1985) การผลิตกรดมะนาวในระยะแรกผลิตโดยการตกตะกอนสารละลายกรดมะนาวในน้ำผลไม้ในรูปของเกลือแคลเซียมซิเตรทแต่ได้ผลผลิตต่ำจึงได้มีการศึกษาการผลิตกรดมะนาวด้วยวิธีอื่น (Kapoor และคณะ, 1983) ต่อมา มีการผลิตกรดมะนาวด้วยการสังเคราะห์กรดมะนาวจากกลีเซอรอล แต่ต้นทุนสูงและผลผลิตมีคุณภาพต่ำไม่เหมาะสำหรับผลิตทางการค้า (Mattey, 1992; Milsom และ Meers, 1985) และได้มีการค้นพบการผลิตกรดมะนาวจากจุลินทรีย์โดยพบว่าเชื้อรา 2 ชนิด คือ *Mucor* และ *Penicillium* สามารถผลิตกรดมะนาวในอาหารที่มีซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน แต่ผลผลิตค่อนข้างต่ำ (Kapoor และคณะ, 1983) ต่อมา มีการศึกษาการผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อรา *A. niger* พบว่าสามารถผลิตกรดมะนาวได้ดีในอาหารที่มีน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนที่ค่าความเป็นกรดต่ำซึ่งช่วยลดปัญหาการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ จึงถูกนำไปผลิตกรดมะนาวในระดับอุตสาหกรรมโดยการหมักบนผิวหน้าอาหาร (surface culture) จากวัตถุดิบที่เป็นน้ำตาลซูโครสและกากน้ำตาล และได้พัฒนาการผลิตเป็นการหมักในอาหารเหลว (submerged culture) จากวัตถุดิบที่เป็นกลูโคสไซรัปและกากน้ำตาล (Klasson และคณะ, 1989) นอกจากนี้เชื้อราแล้วยังพบว่ามียีสต์หลายสายพันธุ์สามารถผลิตกรดมะนาวได้ดีเช่นกันแต่สำหรับแบคทีเรียไม่ได้รับความสนใจเพราะให้ผลผลิตต่ำ (Abou-Zeid และ Ashy, 1984)

2.2 สมบัติของกรดมะนาว

กรดมะนาวมีชื่อทางเคมีว่า กรด 2-ไฮดรอกซี-1,2,3-โพรเพนไตรคาร์บอกซิลิก เป็นกรดอินทรีย์ที่ประกอบด้วยหมู่คาร์บอกซิล 3 หมู่ และหมู่ไฮดรอกซิล 1 หมู่ มีโครงสร้างทางเคมีดังรูปที่ 2.1



รูปที่ 2.1 โครงสร้างทางเคมีของกรดมะนาว

กรดมะนาวที่ปราศจากน้ำ (anhydrous citric acid) มีสูตรโมเลกุล $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ น้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 192.13 ได้จากการตกผลึกสารละลายเข้มข้นของกรดมะนาวที่อุณหภูมิสูงกว่า 36.6 องศาเซลเซียส มีจุดหลอมเหลวที่อุณหภูมิ 153 องศาเซลเซียส ความหนาแน่นเท่ากับ 1.665 สำหรับกรดมะนาวชนิดที่มีน้ำอยู่ 1 โมเลกุล (citric acid monohydrate) มีสูตรโมเลกุล $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ น้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 210.14 ได้จากการตกผลึกสารละลายที่อุณหภูมิต่ำกว่า 36.6 องศาเซลเซียส มีจุดหลอมเหลวที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส กรดมะนาวมีค่า pK_a ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ดังนี้ $pK_{a1} = 3.128$, $pK_{a2} = 4.761$ และ $pK_{a3} = 6.396$ ลักษณะทั่วไปเป็นผลึกสีขาว มีรสเปรี้ยว มีความเป็นพิษต่ำ ย่อยสลายง่าย และละลายในน้ำได้ดี (Bouchard และ Merritt, 1979)

2.3 ประโยชน์ของกรดมะนาว

ปัจจุบันทั่วโลกมีความต้องการกรดมะนาวเพิ่มขึ้น เนื่องจากกรดมะนาวมีความสามารถในการละลายสูง ความเป็นพิษต่ำ มีรสเปรี้ยวและมีคุณสมบัติในการจับไอออนของโลหะหนักและการเป็นบัฟเฟอร์ ดังนั้นจึงมีการนำไปใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น อุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม เกษตรกรรม และอุตสาหกรรมอื่นๆ (Marison, 1988) ดังนี้

2.3.1 อุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม

เป็นสารให้ความเปรี้ยวและเพิ่มรสชาติในน้ำผลไม้ อาหารกระป๋อง เจลลี่ ป้องกันการบูดเสียในเครื่องดื่ม เนยแข็งและเนยเหลว ป้องกันการขุ่นและการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในไวน์ เป็นต้น (Marison, 1988)

2.3.2 อุตสาหกรรมเกษตรกรรม

ใช้ผสมกับไบคาร์บอเนต และคาร์บอเนตในการผลิตยาลดกรดในกระเพาะอาหาร ใช้เตรียมสารละลายสำหรับการป้องกันการแข็งตัวของเลือดและช่วยป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในการเตรียมวิตามิน เป็นต้น (Bouchard และ Merritt, 1979)

2.3.3 อุตสาหกรรมอื่นๆ เช่น

อุตสาหกรรมผงซักฟอกใช้ในรูปเกลือไตรโซเดียมซิเตรทแทนสารเตตระโพแทสเซียมไพโรฟอสเฟต เพราะย่อยสลายง่าย และไม่เป็นพิษต่อสัตว์น้ำ อุตสาหกรรมเครื่องสำอางใช้เป็นสารละลายบัพเฟอร์เพื่อควบคุมค่าความเป็นกรดต่างในเครื่องสำอาง และอุตสาหกรรมโลหะใช้เป็นส่วนผสมในน้ำยาขัดโลหะ น้ำยาล้างสนิม เป็นต้น (Bouchard และ Merritt, 1979)

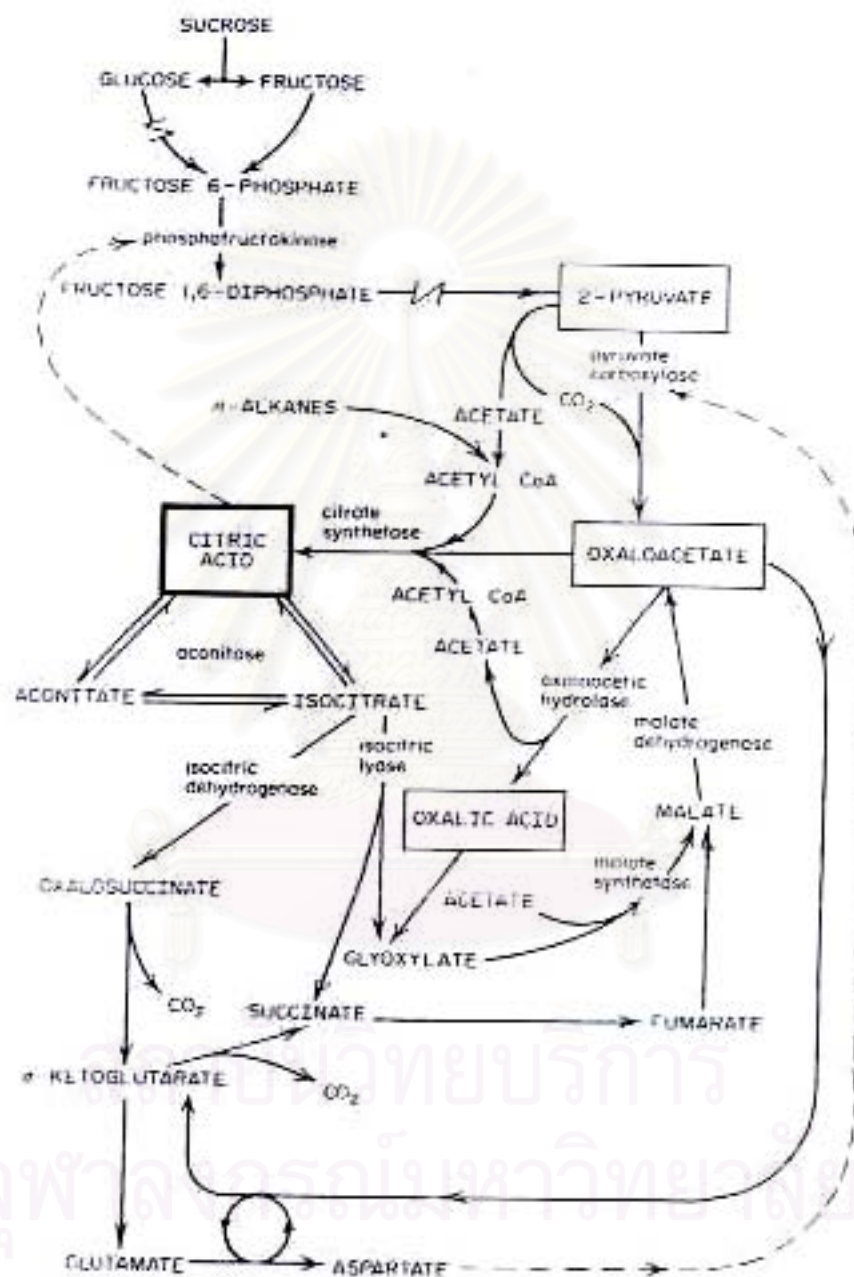
2.4 การผลิตกรดมะนาวด้วยยีสต์

การผลิตกรดมะนาวด้วยเชื้อราพบว่าใช้เวลาในการหมักนานและสายพันธุ์ไม่คงที่ และมียีสต์หลายสายพันธุ์ที่สามารถผลิตกรดมะนาวได้ เช่น *Candida utilis*, *Candida lipolytica*, *Candida tropicalis* (Hamissa และ Aboud-Zeid, 1981; Rane และ Simst, 1995), *Yarrowia lipolytica* (Venter และคณะ, 2004), *Kloeckera sp.*, *Saccharomyces sp.*, *Rhodotorula sp.*, *Sporobolomyces sp.*, เป็นต้น (Marison, 1988) การผลิตกรดมะนาวด้วยยีสต์ได้รับความสนใจมากขึ้นเนื่องจากยีสต์มีข้อดีหลายประการเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อรา เช่น ใช้สารแหล่งคาร์บอนได้หลายชนิดและทนต่อความเข้มข้นของสับสเตรทสูง และยีสต์เจริญเร็วกว่าทำให้เวลาในการหมักสั้นลง รูปแบบการหมักด้วยยีสต์ส่วนมากเป็นการหมักในอาหารเหลวและสามารถหมักแบบแบทช์ (batch fermentation process) (Maddox and Kingston, 1983) แบบต่อเนื่อง (continuous fermentation process) (Rymowicz และคณะ, 1993; Klasson และคณะ, 1989) และแบบเฟดแบทช์ (fed-batch fermentation process) (Rane และ Simst, 1995; Crolla และ Kennedy, 2004) นอกจากนี้ยังมีการนำเอาวิธีต่างๆ มาใช้ร่วมในการผลิตเพื่อเพิ่มผลผลิต เช่น การเวียนเซลล์เพื่อนำกลับมาใช้ใหม่ (Rane และ Simst, 1995; Enzinger และ Asenjo, 1986) การตรึงเซลล์ (cell immobilization) (Maddox and Kingston, 1983; Kautola และคณะ, 1991; Tisnadjaja และคณะ, 1996; Rymowicz และคณะ, 1993) และการแยกผลิตภัณฑ์ควบคู่กับกระบวนการหมัก (extractive fermentation) (Jianlong และคณะ, 2000) เป็นต้น

2.5 ชีวเคมีของการผลิตกรดมะนาวด้วยยีสต์

การผลิตกรดมะนาวด้วยยีสต์นั้น กลูโคสถูกเปลี่ยนเป็นไพรูเวท (pyruvate) โดยวิถีไกลโคไลซิส (glycolysis pathway) ไพรูเวทถูกเปลี่ยนไปเป็นอะซิติล-โคเอ (acetyl-CoA) และรวมกับออกซาโลอะซิเตท (oxaloacetate) โดยเอนไซม์ซิเตรทซินเทส (citrate synthase) ได้กรดมะนาวซึ่งเป็นสารตัวกลางในวัฏจักรเครปส์ (รูปที่ 2.2) การสะสมกรดมะนาวเกิดขึ้นเนื่องจากมีความ

ผลิตภัณฑ์ของวัฏจักรเครปส์โดยมีเอนไซม์สำคัญ 2 ชนิด คือ อะโคนิเตส (aconitase) และไอโซซิเตรท ดีไฮโดรจิเนส (isocitrate dehydrogenase) ช่วงที่มีการผลิตกรดมะนาวนั้นเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดจะมีกิจกรรมลดลง ในขณะที่เอนไซม์ซีเตรทซินเตสมีกิจกรรมสูงขึ้น (Marison, 1988)



รูปที่ 2.2 วิธีการผลิตกรดมะนาวโดยยีสต์ผ่านทางวัฏจักรเครปส์

----- หมายถึง การยับยั้งแบบย้อนกลับ (feedback inhibition)

2.6 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดมะนาวด้วยยีสต์

2.6.1 สายพันธุ์ยีสต์

มียีสต์หลายสายพันธุ์โดยเฉพาะในกลุ่ม *Candida sp.* สามารถผลิตกรดมะนาวได้ดี การเลือกสายพันธุ์ยีสต์ต้องเลือกยีสต์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการผลิตกรดมะนาว ใช้แหล่งคาร์บอนได้หลายชนิด ให้กรดชนิดอื่นที่ไม่ต้องการในปริมาณน้อย ทนต่อโลหะหนัก มีกิจกรรมของเอนไซม์อะโคนิเตสต่ำ และใช้เวลาในการหมักสั้น (Crolla และ Kennedy, 2004)

2.6.2 ภาวะที่เหมาะสมในการผลิต

2.6.2.1 สารแหล่งคาร์บอน

ยีสต์สามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้หลายชนิด ได้แก่ กลูโคส ฟรุคโทส กากน้ำตาล แป้งมันสำปะหลังที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ เซลลูโลสที่ผ่านการย่อย (Rane และ Simst, 1995) แอลกอฮอล์ (Wojtatowicz และคณะ, 1991) กลิเซอรอล (Venter และคณะ, 2004) สารไฮโดรคาร์บอน (Moresi และคณะ, 1980) เป็นต้น โดยที่ชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ที่ใช้ นอกจากนี้ควรเป็นสารที่หาได้สม่าเสมอและราคาถูกเพื่อให้สามารถขยายไปสู่ระดับอุตสาหกรรมได้ (Marison, 1988)

2.6.2.2 สารแหล่งไนโตรเจน

การผลิตกรดมะนาวโดยยีสต์จำเป็นจะต้องควบคุมปริมาณสารแหล่งไนโตรเจนให้เพียงพอต่อการเจริญเท่านั้นเนื่องจากยีสต์จะสะสมกรดมะนาวหลังจากที่แหล่งไนโตรเจนในอาหารถูกใช้หมดแล้ว (Rane และ Simst, 1995) สำหรับชนิดของสารแหล่งไนโตรเจนพบว่า ยีสต์สามารถใช้ได้ทั้งในรูปของอินทรีย์ไนโตรเจน ได้แก่ สารสกัดจากยีสต์ เปปโตน น้ำแช่ข้าวโพด (cornsteep liquor) และอินทรีย์ไนโตรเจน ได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมคลอไรด์ (Wojtatowicz และคณะ, 1991) แอมโมเนียมไนเตรท เป็นต้น ชนิดของสารแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมจะขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ยีสต์ ซึ่งอาจเลือกใช้ชนิดใดชนิดหนึ่งหรือใช้ควบคู่กัน (Hamissa และคณะ, 1981)

2.6.2.3 ฟอสเฟต

ฟอสเฟตเป็นสารที่จำเป็นต่อการเจริญและการผลิตกรดมะนาวด้วยยีสต์ ฟอสฟอรัสเป็นปัจจัยที่จำเป็นต่อเมตาบอลิซึมเพื่อให้ได้พลังงานและยังเป็นองค์ประกอบของส่วนสำคัญต่างๆในเซลล์ เช่น กรดนิวคลีอิก นิวคลีโอไทด์ และฟอสโฟลิปิด เป็นต้น ดังนั้นการจำกัดปริมาณฟอสเฟตซึ่งมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์และการไม่แสดงออกของยีนทำให้เกิดการสะสมของกรดมะนาว (Kubicek และ Rohr, 1986) โดยรูปของฟอสเฟตที่นิยมใช้คือ โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (Abou-Zeid และ Ashy, 1984)

2.6.2.4 แร่ธาตุ

แร่ธาตุหลายชนิดมีผลต่อการเจริญและการผลิตกรดมะนาวด้วยยีสต์ เช่น แมกนีเซียม แมงกานีส เหล็ก ทองแดง สังกะสี ตะกั่ว เป็นต้น มีการศึกษาพบว่าแมกนีเซียมซัลเฟต และแมงกานีสซัลเฟต เป็นแร่ธาตุที่จำเป็นต่อการผลิตกรดมะนาว (Abou-Zeid และ Ashy, 1984) และแมกนีเซียมยังเป็นโคแฟกเตอร์ของเอนไซม์หลายชนิดภายในเซลล์ที่สำคัญคือ เอนไซม์จำพวก ไคเนส (Marison, 1988) เมื่อเติมเหล็กซัลเฟตลงในอาหารเลี้ยงเชื้อทำให้เชื้อ *Candida sp.* ผลิตกรดมะนาวได้น้อยลงแต่ผลิตกรดไอโซซิทริกมากขึ้น (Furukawa และคณะ, 1977) ในขณะที่เมื่อเติมทองแดงซัลเฟตความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตรเชื้อยีสต์จะผลิตกรดมะนาวเพิ่มขึ้น และในอาหารที่เติมสารตะกั่วปริมาณ 0.5 - 1.5 กรัมต่อลิตร เชื้อยีสต์จะผลิตกรดมะนาวสูงกว่าในอาหารที่ไม่มีการเติมสารตะกั่ว (Fired, 1972) ส่วนเหล็กไอออนจะกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์อะโคนิตสทำให้กรดมะนาวถูกเปลี่ยนเป็นกรดไอโซซิทริก (Marison, 1988)

2.6.2.5 สารเสริมอื่นๆ

นอกจากสารต่างๆ ดังกล่าวข้างต้นแล้วยังมีการเติมสารบางชนิดซึ่งเป็นสารที่จำเป็นสำหรับการเจริญและการผลิตกรดมะนาวของยีสต์ เช่น ไชอะมีน ซึ่งอยู่ในรูปของ ไชอะมีนไฮโดรคลอไรด์ กรดนิโคตินิก และไบโอติน หรือเติมสารประกอบอินทรีย์ เช่น สารสกัดจากยีสต์ และน้ำแช่ข้าวโพด (Abou-Zeid และ Ashy, 1984)

2.6.2.6 ค่าความเป็นกรดต่าง

การผลิตกรดมะนาวโดยยีสต์ เมื่อมีการสะสมกรดมะนาวระหว่างการหมัก จำเป็นต้องเติมสารที่ใช้ปรับค่าความเป็นกรดต่างลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น แคลเซียมคาร์บอเนต (Kautola และคณะ, 1991) โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Tisnadaja และคณะ, 1996; Wojtatowicz และคณะ, 1991) โซเดียมคาร์บอเนต แคลเซียมไฮดรอกไซด์ และโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ เป็นต้น เพื่อควบคุมค่าความเป็นกรดต่างที่ลดลงซึ่งจะมีผลยับยั้งการเจริญและการผลิตกรดมะนาว (Moresi และคณะ, 1980) โดยที่ค่าความเป็นกรดต่างของอาหารเลี้ยงเชื้อจะอยู่ในช่วง 4.5 - 6.5 ในการเลือกใช้สารใดย่อมขึ้นอยู่กับความเหมาะสม สำหรับการผลิตกรดมะนาวในระดับขวดเขย่านิยมใช้แคลเซียมคาร์บอเนต โดยการเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อตั้งแต่เริ่มต้น (Kubicek และ Rohr, 1986)

2.6.2.7 อุณหภูมิ

อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและการผลิตกรดมะนาวนั้นขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ที่ใช้ โดยทั่วไปอยู่ระหว่าง 25 - 30 องศาเซลเซียส (Marison, 1988) มีการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการผลิตกรดมะนาวโดยยีสต์ *Candida citrica* MT-1001 พบว่าที่อุณหภูมิสูงหรือต่ำเกินไปจะทำให้การผลิตกรดมะนาวลดลง เนื่องจากยีสต์นำสับสเตรทไปใช้ในการเจริญเติบโตมาก และใช้สร้างกรดอินทรีย์อื่นๆ แทนกรดมะนาว เช่น กรดไอโซซิทริก เป็นต้น (Furukawa และคณะ, 1977)

2.6.2.8 การให้อากาศและการกวน

การผลิตกรดอะมิโนด้วยยีสต์เป็นการหมักในภาวะที่ต้องการอากาศ ดังนั้นในระหว่างการหมักโดยเฉพาะในช่วงที่เชื้อมีการเจริญจำเป็นต้องให้อากาศอย่างเพียงพอซึ่งการถ่ายเทออกซิเจนในถังหมักขึ้นกับองค์ประกอบหลายอย่างเช่น อัตราการให้อากาศ และอัตราการกวนซึ่งต้องใช้ควบคู่กันอย่างเหมาะสม และหากมีการเพิ่มค่าออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักจะมีผลทำให้ประสิทธิภาพการผลิตกรดอะมิโนด้วยยีสต์สูงขึ้น (Rane และ Simst, 1995)

2.7 วิธีการตรึงเซลล์จุลินทรีย์

การตรึงเซลล์จุลินทรีย์เป็นการจำกัดเซลล์ให้อยู่ในขอบเขตที่กำหนด แต่ยังคงคุณสมบัติในการเป็นแหล่งผลิตเอนไซม์และมีความสามารถในการเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาสามารถใช้ในการผลิตแบบต่อเนื่องได้ (Chibata, 1978) เซลล์ตรึงมีสมบัติที่ดีเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์อิสระ ได้แก่ มีความเสถียรมากกว่าเซลล์อิสระ นำกลับมาใช้ซ้ำได้ ช่วยให้แยกผลผลิตได้ง่ายและช่วยเพิ่มอัตราการผลิตเนื่องจากมีเซลล์จำนวนมากที่ถูกกักอยู่ในตัวกลางที่ใช้ตรึง (Tisnadjaja และคณะ, 1996; Santos และคณะ, 2005) แต่เซลล์ตรึงมีข้อเสียบางประการเมื่อนำไปใช้ในการหมัก เช่น มีเซลล์หลุดออกจากตัวกลางที่ใช้ตรึง ข้อจำกัดของการแพร่ผ่านของสารที่มีความจำเป็นต่อการเจริญของเซลล์ เช่น สารอาหาร อากาศ เป็นต้น

การตรึงเซลล์ตามเทคนิคของ Chibata (1978) มี 3 วิธีคือ วิธีการยึดด้วยสารตัวกลาง (Carrier-binding method) วิธีการเชื่อมไขว้ (Cross-linking method) และวิธีการกักขัง (Entrapment method) ดังนี้

2.7.1 วิธีการยึดด้วยสารตัวกลาง หมายถึง การเชื่อมเซลล์กับสารตัวกลางโดยตรง แบ่งได้ 2 วิธี ดังนี้

2.7.1.1 การเกาะกันด้วยพันธะโควาเลนต์ (Covalent binding method)

เป็นการเชื่อมเซลล์โดยตรงกับสารตัวกลาง โดยสารตัวกลางที่ใช้สามารถเชื่อมต่อกับส่วนประกอบที่ยึดเซลล์ เช่นกลุ่มอะมิโน กลุ่มคาร์บอกซิล กลุ่มไฮดรอกซิล ของโปรตีน ข้อดีของวิธีนี้คือ เซลล์ถูกเชื่อมอยู่ที่ผิวหน้าของสารตัวกลางอย่างสม่ำเสมอทำให้มีความคงตัวและมีการหลุดของเซลล์น้อย (Cheetham, 1980) ข้อเสียของการตรึงเซลล์ด้วยวิธีนี้คือความเป็นพิษของสารตัวกลางที่ใช้ อาจทำให้เซลล์สูญเสียกิจกรรมได้

2.7.1.2 วิธีการดูดซับ (Adsorption method)

เซลล์จะดูดซับบนกับสารตัวกลางด้วยพันธะไอออนิกหรือพันธะไฮโดรเจนโดยอาศัยหลักทางธรรมชาติเคมีเนื่องจากผนังของเซลล์ประกอบด้วยกรดไดอะมิโนไพเลมิก (Diaminopimelic acid) และเฮกโซซามีน (Hexosamines) ซึ่งสามารถเกิดพันธะไอออนิกกับสาร

ตัวกลางได้ การตรึงเซลล์ด้วยวิธีนี้สามารถทำได้ง่ายแต่แรงดูดซับค่อนข้างอ่อนทำให้เซลล์หลุดได้ง่ายเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดต่างหรือการไหลของเหลวในน้ำหรือการเกิดฟองอากาศ หรือขณะมีการแบ่งเซลล์ (Cheetham, 1980; Koshcheenko, 1981)

2.7.2 วิธีการเชื่อมไขว้ (Cross-linking method)

เป็นการเชื่อมเซลล์เข้ากับสารตัวกลางโดยใช้สารพวก 2 หมู่ฟังก์ชัน (bi-functional reagent) หรือสารมัลติฟังก์ชัน (Multifunctional reagent) เช่น กลูทาร์ลดีไฮด์ (Glutaraldehyde) และ โทลูอิน ไดไอโซไซยาเนต (Toluene diisocyanate) เป็นต้น การตรึงเซลล์ด้วยวิธีนี้จะต้องทำภายใต้ภาวะที่รุนแรงอาจทำให้เซลล์ตายได้

2.7.3 การกักขัง (Entrapment method) แบ่งได้ 2 วิธี ดังนี้

2.7.3.1 การตรึงเซลล์แบบไมโครแคปซูล (Microencapsulation)

เป็นการกักขังเซลล์ในสารตัวกลางที่มีสมบัติเป็นเยื่อกึ่งผ่าน (Semipermeable membrane) เช่น สารพวกคอลลอยด์ หรือซิลิโคน ซึ่งสามารถป้องกันการซึมผ่านเยื่อของเซลล์แต่ยอมให้สับสเตรทและผลผลิตผ่านเยื่อได้อย่างอิสระ เป็นวิธีที่ง่ายแต่เซลล์ตรึงไม่แข็งแรงพอที่จะใช้ในอุตสาหกรรมและอาจมีปัญหาการตกตะกอนของเซลล์เกิดขึ้นด้วย (Cheetham, 1980)

2.7.3.2 การตรึงเซลล์แบบแลตทิซ (Lattice type)

เป็นวิธีที่ได้รับความนิยมเพราะสามารถใช้ได้กับเซลล์ทุกชนิด โดยการกักขังเซลล์ไว้ในช่องว่าง 3 มิติในเจลของสารตัวกลางที่เป็นสารโพลิเมอร์ซึ่งนิยมใช้สารพวก biochemically inert hydrogel และใช้หลักการเกิดเจลซึ่งทำให้เกิดโครงสร้าง 3 มิติ ที่มีลักษณะเป็นรูพรุน

ในการเตรียมเซลล์ตรึงมีหลายวิธีขึ้นอยู่กับสมบัติของสารตัวกลางที่ใช้ในการตรึงเซลล์ซึ่งแต่ละวิธีมีข้อปด้อยแตกต่างกันได้ แต่โดยทั่วไปแล้วปัจจัยที่สำคัญในการพิจารณา คือ สมบัติทางกลศาสตร์ (Mechanical property) สมบัติทางกายภาพ (Physical property) ความแข็งแรง (Strength) ความชอบน้ำ (Hydrophilicity) สภาพให้ซึมผ่าน (Permeability) ความทนต่อสภาพแวดล้อมทางกายภาพ สารเคมี และการย่อยสลายของจุลินทรีย์ เป็นต้น นอกจากนี้การตรึงเซลล์ต้องให้อยู่ในภาวะที่ปลอดภัยจึงต้องเลือกสารที่ทนต่อความร้อนและความดันสูง สารตัวกลางต้องไม่เป็นอันตรายต่อเซลล์และสิ่งแวดล้อม และไม่กระทบกระเทือนต่อระบบเมตาบอลิซึมของเซลล์ และควรพิจารณาในด้านราคา การยอมรับ และความสามารถในการนำกลับมาใช้ใหม่ได้อีก

2.8 การผลิตกรดมะนาวด้วยยีสต์ครึ่ง

มีการศึกษาโดยนำวิธีการครึ่งเซลล์มาใช้ในกระบวนการหมัก เช่น การผลิตแอลกอฮอล์ด้วยเซลล์ครึ่ง *Saccharomyces cerevisiae* (Najafpour และคณะ, 2004) การผลิตกรดแลคติกด้วยเซลล์ครึ่ง *Rhizopus oryzae* (Xuenmei และคณะ, 1999) การผลิตไซลิทอลด้วยเซลล์ครึ่ง *Candida guilliermondii* (Silva และคณะ, 2003) การผลิตกลูโคสไมเลสด้วยเซลล์ครึ่ง *Kluyveromyces lactis* (Alteriis และคณะ, 2004) เป็นต้น และยังมีการนำเอาวิธีการครึ่งเซลล์มาใช้ในการผลิตกรดมะนาวเพื่อเพิ่มผลผลิตกรดมะนาว

มีรายงานการศึกษาการผลิตกรดมะนาวด้วยยีสต์ครึ่ง ได้แก่ การครึ่งเซลล์ยีสต์ *Saccharomycopsis lipolytica* ด้วยวิธีกักขังในพอลิเอไครลาไมด์ (polyacrylamide) เลี้ยงเซลล์ในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเซลล์ครึ่งมีอัตราการผลิตกรดมะนาวเท่ากับ 50 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ซึ่งให้ค่าสูงกว่าการผลิตด้วยเซลล์อิสระ (อัตราการผลิตเท่ากับ 10 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง) สามารถเก็บเซลล์ครึ่งที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วันโดยไม่สูญเสียความสามารถในการเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (Maddox และ Kingston, 1983) ต่อมาการศึกษาการผลิตกรดมะนาวด้วยยีสต์ครึ่ง *Yarrowia lipolytica* ทั้งในขวดเขย่าและถังหมักแบบแอร์ลิฟต์ เปรียบเทียบสารตัวกลางชนิดต่างๆ ที่ใช้ครึ่ง คือ แคลเซียมอัลจินเต แคลปาคาร์ราจินแน พอลิยูรีเทนเจล ในตอนแรกพบว่าการหมักในขวดเขย่าเมื่อใช้แคลเซียมอัลจินเตเป็นสารตัวกลางให้อัตราการผลิตกรดมะนาวสูงสุดเท่ากับ 155 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง สำหรับการหมักในถังหมักแบบแอร์ลิฟต์ (air-lift fermentor) เมื่อใช้แคลปาคาร์ราจินแนเป็นสารตัวกลางให้อัตราการผลิตกรดมะนาวสูงสุดเท่ากับ 120 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง (Kautola และคณะ, 1991)

นอกจากนี้ยังนำเอาการครึ่งเซลล์มาใช้ร่วมกับการผลิตกรดมะนาวแบบต่อเนื่องโดยครึ่งเซลล์ยีสต์ *Yarrowia lipolytica* A-101 ในแคลเซียมอัลจินเตและผลิตกรดมะนาวในถังหมักแอร์ลิฟต์แบบต่อเนื่อง พบว่าให้อัตราการผลิตสูงสุดเท่ากับ 350 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง (Rymowicz และคณะ, 1993) และมีการศึกษาครึ่งเซลล์เพื่อผลิตกรดมะนาวโดยวิธีดูดซับบนวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร ซึ่งเป็นวิธีที่ประหยัด ทำได้ง่าย โดยครึ่งเซลล์ *Candida guilliermondii* บนจีลีสและหมักในถังหมัก bubble column แบบต่อเนื่อง พบว่าให้อัตราการผลิตกรดมะนาวเท่ากับ 0.24 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ในขณะที่การผลิตกรดมะนาวด้วยเซลล์อิสระในการหมักแบบชั้ให้อัตราการผลิตกรดมะนาวเพียง 0.18 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง (Tisnadjaja และคณะ, 1996)

2.9 การหมักด้วยระบบ perfusion ใช้ร่วมกับ spinfiler

ระบบ perfusion เป็นระบบที่ถูกนำมาใช้ในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากไฮบริโดมาเซลล์ โดยทั่วไปไฮบริโดมาเซลล์เจริญค่อนข้างช้า ต้องใช้ระยะเวลาการหมักนาน ดังนั้นจึงต้องทำการควบคุมภาวะในการหมักให้มีความเหมาะสมต่อการเจริญและต้องป้อนสารอาหารเข้าไปในถังหมักพร้อมกับดึงเอาผลิตภัณฑ์ออกระหว่างการหมักแบบต่อเนื่อง ดังนั้นจึงต้องใช้ spinfiler ซึ่งเป็นอุปกรณ์ที่มีขนาดรูพรุนขนาดเล็ก มีผิวเรียบมาช่วยในการหมัก โดยนำมาแยกเซลล์ออกจากผลิตภัณฑ์ระหว่างการหมัก ช่วยให้การแยกทำได้สะดวกเพราะไม่ต้องปั่นแยกเซลล์ออกจากน้ำหมักภายนอกถังหมัก สามารถผลิตแบบต่อเนื่องได้ดี เซลล์ไม่หลุดออกจากระบบและเซลล์เจริญได้เป็นระยะเวลานานในถังหมักทำให้อัตราการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีเพิ่มขึ้น

มีรายงานการใช้ระบบ perfusion โดยใช้ spinfiler สำหรับแยกผลิตภัณฑ์ในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี โดยศึกษาการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากไฮบริโดมาเซลล์ไลน์ H22 แบบต่อเนื่อง พบว่าที่อัตรา perfusion เท่ากับ 0.75, 2.0 และ 2.9 ต่อวัน ทำให้ได้ความหนาแน่นของเซลล์สูงสุดเท่ากับ 2×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และภายใต้ภาวะของการหมักพบว่าอัตราการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะมีค่าเพิ่มขึ้นตามความหนาแน่นเซลล์ที่เพิ่มขึ้นและอัตราการใช้สารอาหารและอัตราการผลิตมีค่าเพิ่มขึ้นตามอัตราการเจริญจำเพาะของเซลล์ที่เพิ่มขึ้น (Gautam และ Carole, 1995) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีแบบเฟดแบทช์เพอร์ฟิวชัน (feb-batch and perfusion) เพื่อเพิ่มอัตราการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีในถังหมักขนาด 5 ลิตร และใช้ spinfiler ขนาดรูพรุนเท่ากับ 10 ไมโครเมตร พบว่าได้ความหนาแน่นของเซลล์ปริมาณสูงมากกว่า 1.9×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ทำให้อัตราการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีเพิ่มขึ้นเท่ากับ 325 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อวัน (Feng และคณะ, 2005)

เนื่องจากการหมักระบบ perfusion โดยใช้ spinfiler มีข้อดีที่คล้ายคลึงกับการตรึงเซลล์คือ ทำให้เซลล์ไม่หลุดออกจากระบบและเซลล์สามารถเจริญได้เป็นระยะเวลานานในถังหมักโดยไม่สูญเสียแอกติวิตี ช่วยให้การแยกผลิตภัณฑ์ระหว่างการหมักทำได้สะดวก และหมักแบบต่อเนื่องได้ ดังนั้นจึงเป็นอีกวิธีการหนึ่งที่น่าสนใจที่จะนำมาประยุกต์ใช้กับการผลิตกรดอะมิโนด้วยเซลล์อิสระเพื่อเป็นการพัฒนากระบวนการผลิตและช่วยเพิ่มผลผลิตกรดอะมิโน

2.10 การแยกกรดอะมิโน

การผลิตกรดอะมิโนด้วยยีสต์นั้น ยีสต์จะใช้แหล่งคาร์บอนผ่านกระบวนการไกลโคไลซิสแล้วเข้าสู่วัฏจักรเครปส์ (Krebs cycle) ดังนั้นในน้ำหมักจึงมีสิ่งปนเปื้อนและสารประกอบพลอยได้ จึงต้องมีขั้นตอนการแยกกรดอะมิโนและทำให้บริสุทธิ์ โดยแยกจุลินทรีย์ออกจากน้ำหมัก

โดยการกรอง (filtration) หรือการปั่นเหวี่ยง (centrifugation) (Widiasa และคณะ, 2004) แล้วนำน้ำหมักมาแยกกรรมะนาว วิธีการแยกกรรมะนาวที่ใช้ทั่วไปในเชิงการค้ามี 2 วิธี ดังนี้

2.10.1 การแยกกรรมะนาวโดยการตกตะกอน (Classical method)

เป็นวิธีการแยกดั้งเดิม ทำได้โดยนำน้ำหมักที่แยกเซลล์ออกแล้วมาตกตะกอนด้วยแคลเซียมออกไซด์ แคลเซียมไฮดรอกไซด์ หรือแคลเซียมคาร์บอเนต แล้วกรองแยกกรรมะนาวในรูปเกลืออัลคาไลน์เอิร์ทออกจากน้ำหมัก นำตะกอนมาละลายด้วยกรดซัลฟูริก ไอออนของแคลเซียมจะรวมตัวกับไอออนซัลเฟตเป็นเกลือแคลเซียมซัลเฟตซึ่งมีสมบัติละลายน้ำได้น้อยจึงสามารถแยกออกจากสารละลายกรรมะนาวด้วยการกรอง ข้อเสียของการแยกด้วยวิธีนี้คือ เกิดของแข็งเหลือทิ้งแคลเซียมซัลเฟตในปริมาณมาก และอาจเกิดการปนเปื้อนของเศษแคลเซียมซัลเฟตที่แตกหักด้วย (Annadurai และคณะ, 1996; Bailly และคณะ, 2001; Pazouki และ Panda, 1998)

2.10.2 การแยกกรรมะนาวด้วยตัวทำละลาย (Solvent extraction)

การแยกด้วยวิธีนี้มีข้อดีคือ ไม่มีของเหลือทิ้งจากการแยก การแยกสามารถใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ ตัวทำละลายเอมีน หรือด้วยเกลือเอมีน (Beniel, 1982) หลังจากแยกกรรมะนาวจากน้ำหมักให้อยู่ในตัวทำละลายแล้ว แยกกรรมะนาวออกจากตัวทำละลายเอมีนอีกครั้งด้วยน้ำประสิทธิภาพการแยกขึ้นอยู่กับสารเคมีที่ใช้ ภาวะของการแยก และจำนวนขั้นตอนที่ใช้ในการแยก เพื่อให้สูญเสียกรรมะนาวน้อยที่สุด การแยกกรรมะนาวด้วยวิธีนี้มีข้อเสีย คือมีสารปนเปื้อนจากน้ำหมักปนออกมามากจึงไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ (Sarmidi และคณะ, 2002)

ขั้นตอนการแยกกรรมะนาวเป็นส่วนที่เพิ่มค่าใช้จ่ายในการกระบวนการผลิต เพื่อลดค่าใช้จ่ายและให้การแยกเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพจึงได้มีการศึกษานำเอาเทคนิคอื่นๆ มาใช้ร่วมในกระบวนการหลังการผลิต เช่น การใช้เมมเบรน (membrane) การใช้อิเล็กโทรไดอะไลซิส (electrodialysis) การใช้อิเล็กโทรดีไอออไนซ์ (electrodeionization) (Widiasa และคณะ, 2004) และการแยกผลิตภัณฑ์ระหว่างผลิตโดยการแลกเปลี่ยนไอออนบนเรซิน (extractive fermentation) (Jianlong และคณะ, 2000) ซึ่งเป็นอีกวิธีการหนึ่งที่มีการศึกษาและนำมาใช้ในการผลิตระดับอุตสาหกรรมเพราะทำได้ง่าย ไม่ก่อให้เกิดของเหลือทิ้งจากการแยก สามารถขยายขนาดจากระดับต้นแบบให้เป็นระดับอุตสาหกรรมได้ และเมื่อทำการหมักแบบต่อเนื่องจะให้อัตราการผลิตสูง เพราะช่วยลดปัญหาการยับยั้งการเกิดผลิตภัณฑ์เนื่องจากการสะสมผลิตภัณฑ์ในระหว่างการหมัก (Ye และคณะ, 1996; Cao และคณะ, 2002)

2.11 การแลกเปลี่ยนไอออน (Ion exchange)

การแลกเปลี่ยนไอออนเป็นปฏิกิริยาการแลกเปลี่ยนไอออนกลับไปกลับมา (reversible interchange) ระหว่างตัวกลาง 2 ชนิด คือตัวกลางของเหลวและของแข็ง โดยไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงทางด้านโครงสร้างของตัวกลางของแข็งที่ใช้มากจะเป็นเรซิน (resin) การแลกเปลี่ยนไอออนถูกนำมาประยุกต์ใช้ในหลายๆ ด้าน เช่น การแก้ความกระด้างของน้ำ การทำให้น้ำบริสุทธิ์ การกำจัดสารอินทรีย์ เป็นต้น

2.11.1 โครงสร้างของเรซินแลกเปลี่ยนไอออน

เรซินมีโครงสร้างที่ประกอบด้วย 2 ส่วนสำคัญ คือ โครงร่างที่ไม่มีประจุไฟฟ้าและหมู่ไอออนที่มีประจุไฟฟ้า (functional group) โครงร่างของเรซินเป็นส่วนที่ทำให้เรซินคงรูปโดยไม่ละลายน้ำและไม่แตกหัก สร้างขึ้นจากสารประกอบไฮโดรคาร์บอนจำนวนมากที่เป็นชนิดเดียวกัน ซึ่งต่อกันเป็นเส้นยาวและมีไฮโดรคาร์บอนอีกชนิดหนึ่งมาทำหน้าที่ประสานเพื่อให้เกิดเป็นรูป 3 มิติ ที่มีความโปร่งหรือความพรุนซึ่งมีความสำคัญต่อความสามารถในการแลกเปลี่ยนไอออน และหมู่ไอออนที่มีประจุไฟฟ้าจะเกาะจับอยู่บน โครงร่างไฮโดรคาร์บอนทำให้เรซินมีประจุบวกหรือลบ

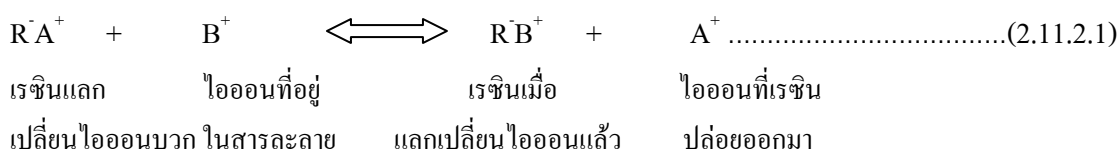
โครงร่างไฮโดรคาร์บอนและหมู่ไอออนที่มีประจุไฟฟ้าจับตัวกันเป็นส่วนประกอบถาวรของเรซินและจำเป็นต้องมีไอออนอิสระที่มีประจุตรงข้ามมาทำให้เรซินเป็นกลาง โดยเรซินจะมีไอออน H^+ , Na^+ , Cl^- , OH^- ตัวใดตัวหนึ่งเป็นไอออนอิสระ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของเรซินและสิ่งที่ต้องการกำจัดออกจากสารละลาย ไอออนอิสระนี้จะจับอยู่กับหมู่ไอออนของเรซินแบบชั่วคราวและพร้อมที่จะแลกเปลี่ยนไอออนกับไอออนอื่นที่ต้องการกำจัดออกจากสารละลาย

2.11.2 ประเภทของเรซินแลกเปลี่ยนไอออน

ชนิดของไอออนที่เกาะบนเรซินมีผลต่อสมดุลและความจำเพาะเจาะจงของเรซินสามารถแบ่งประเภทของเรซินได้ดังนี้

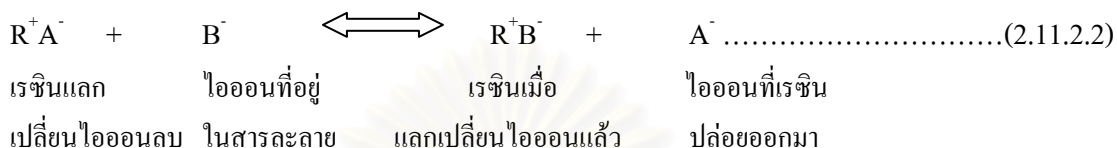
2.11.2.1 เรซินแลกเปลี่ยนไอออนบวก (Cation-exchange resin)

คือเรซินที่ประกอบด้วยหมู่ไอออน เช่น $-OH$, $-COOH$, $-PO(OH)_2$, SO_3H เป็นต้น ซึ่งสามารถทำปฏิกิริยากับไอออนบวก (cation) จากสารละลายที่อยู่ใกล้เคียงได้ แบ่งย่อยได้เป็น เรซินแบบกรดแก่ (strong acid ion exchange resin) และ เรซินแบบกรดอ่อน (weak acid ion exchange resin) มีปฏิกิริยาดังนี้



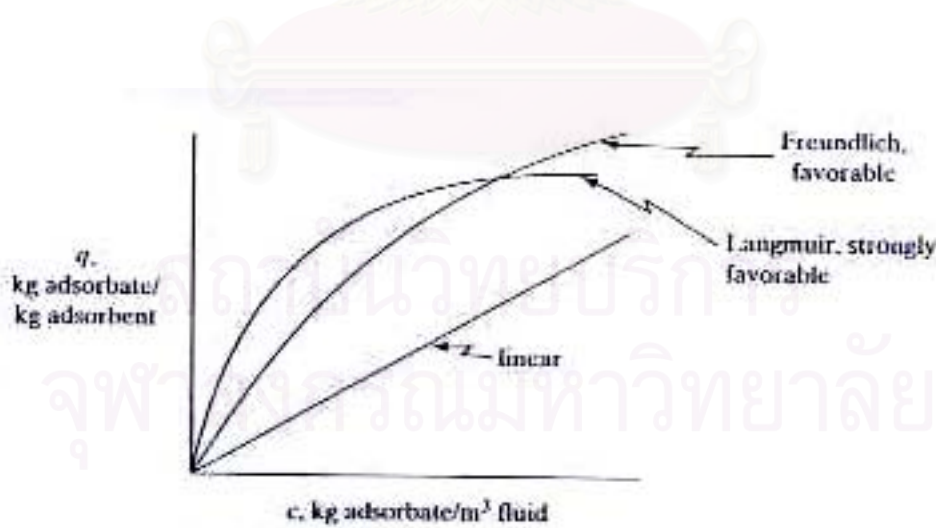
2.11.2.2 เรซินแลกเปลี่ยนไอออนลบ (Anion-exchange resin)

คือเรซินที่ประกอบด้วยหมู่ไอออน เช่น หมู่อะมิโน (-NH₂) ทั้ง Primary, Secondary และ Tertiary amine และหมู่ Quaternary Ammonium ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับไอออนลบ (Anion) จากสารละลายที่อยู่ใกล้เคียงได้ แบ่งย่อยได้เป็นเรซินแบบด่างแก่ (strong basic ion exchange resin) และ เรซินแบบด่างอ่อน (weak basic ion exchange resin) มีปฏิกิริยาดังนี้



2.11.3 สมดุลของเรซิน

การแลกเปลี่ยนไอออนไม่ใช่ปฏิกิริยาทางเคมีแต่เป็นการดูดซับ (adsorption) ของตัวถูกละลายบริเวณผิวของเรซินที่สมดุลเป็นสมดุลระหว่างความเข้มข้นของตัวถูกละลายในสารละลายกับความเข้มข้นของตัวถูกละลายบนเรซิน เป็นความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นตัวถูกละลายบนเรซิน (*q*) มีหน่วย กิโลกรัมตัวถูกละลายต่อกิโลกรัมเรซินและความเข้มข้นตัวถูกละลายในสารละลาย (*c*) มีหน่วยกิโลกรัมตัวถูกละลายต่อปริมาตรของสารละลาย เรียกว่า Adsorption isotherm แบ่งได้เป็น 3 ประเภท (ดังรูปที่ 2.3) ดังนี้



รูปที่ 2.3 Adsorption isotherm ทั้ง 3 ประเภท

2.11.3.1 Linear isotherm

สมคุณลักษณะนี้จะพบเมื่อทำการดูดซับสารละลายที่ความเข้มข้นของสารละลายต่ำๆ มีสมการความสัมพันธ์สอดคล้องกับสมการของ Henry (Henry's law)

$$q = Kc \dots\dots\dots(2.11.3.1)$$

เมื่อค่า K เป็นค่าคงที่มีหน่วย ลิตรต่อกิโลกรัมเรซิน

2.11.3.2 Freundlich isotherm

สมคุณลักษณะนี้มักจะถูกนำไปอธิบายระบบที่มีการดูดซับแบบกายภาพ มีความสัมพันธ์ ดังนี้

$$q = Kc^n \dots\dots\dots(2.11.3.2)$$

เมื่อค่า K และ n เป็นค่าคงที่ และถ้าทำการเขียนกราฟ log-log ระหว่างค่า q และ c ค่า slope ที่ได้เป็นค่า n โดยที่ค่า K จะขึ้นกับค่าของ n (Geankoplis, 1993)

2.11.3.3 Langmuir isotherm มีสมการความสัมพันธ์ ดังนี้

$$q = \frac{q_0 c}{K + c} \dots\dots\dots(2.11.3.3)$$

เมื่อค่า q_0 และ K เป็นค่าคงที่มีหน่วย กิโลกรัมตัวถูกละลายต่อกิโลกรัมเรซิน และ กิโลกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ใช้อธิบายการดูดซับบริเวณผิวของเรซินแบบ monolayer ที่สมคุณสามารถหาค่าตัวแปรต่างๆในสมการได้โดยเขียนความสัมพันธ์ระหว่างค่า $1/q$ และ $1/c$ โดยที่ค่า slope ที่ได้คือค่า K/q_0 และ intercept คือค่า $1/q_0$ โดยทั่วไประบบของการดูดซับจะขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ โดยที่ถ้าเพิ่มอุณหภูมิมีผลทำให้ปริมาณของตัวถูกละลายที่ดูดซับบนเรซินลดลง ดังนั้นเพื่อให้การดูดซับมีประสิทธิภาพจึงต้องกระทำที่อุณหภูมิห้องเพราะมีสภาวะที่ใกล้เคียงกับสภาวะเชิงปฏิบัติ และสามารถทำได้ง่าย (Geankoplis, 1993)

2.11.4 การทำงานของระบบการแลกเปลี่ยนไอออน แบ่งได้ 2 ประเภท คือ

2.11.4.1 การทำงานแบบแบทช์ (Batch process)

เป็นกระบวนการแลกเปลี่ยนไอออนที่ง่ายที่สุด ส่วนมากจะใช้ดูดซับตัวถูกละลายที่มีปริมาณน้อย สารละลายจะถูกกวนผสมกับเรซินในถัง จากนั้นจึงแยกเรซินออกโดยการกรองหรือตกตะกอน ความสามารถในการแลกเปลี่ยนไอออนของวิธีนี้ขึ้นอยู่กับค่าคงที่สมคุณของ

ระบบการแลกเปลี่ยนไอออนและพบว่าจะมีสมมูลแบบ Freundlich หรือ Langmuir และต้องอาศัยหลักการของ material balance ดังแสดงในสมการที่ 2.11.4.1

$$q_F M + c_F S = qM + cS \quad \dots\dots\dots(2.11.4.1)$$

โดยที่	c_F	คือ ความเข้มข้นเริ่มต้นของตัวถูกละลาย (กรัมต่อลิตร)
	c	คือ ความเข้มข้นของตัวถูกละลายที่สมดุล (กรัมต่อลิตร)
	q_F	คือ ความเข้มข้นเริ่มต้นของตัวถูกละลายที่ดูดซับบนเรซิน (กรัมต่อลิตร)
	q	คือ ความเข้มข้นของตัวถูกละลายที่ดูดซับบนเรซินที่สมดุล (กรัมต่อลิตร)
	M	คือ ปริมาณของเรซิน (กรัมหรือกิโลกรัม)
	S	คือ ปริมาตรของสารละลาย (ลิตร)

เมื่อแปรค่า q และเขียนความสัมพันธ์ระหว่างค่า q และ c ได้กราฟเส้นตรง

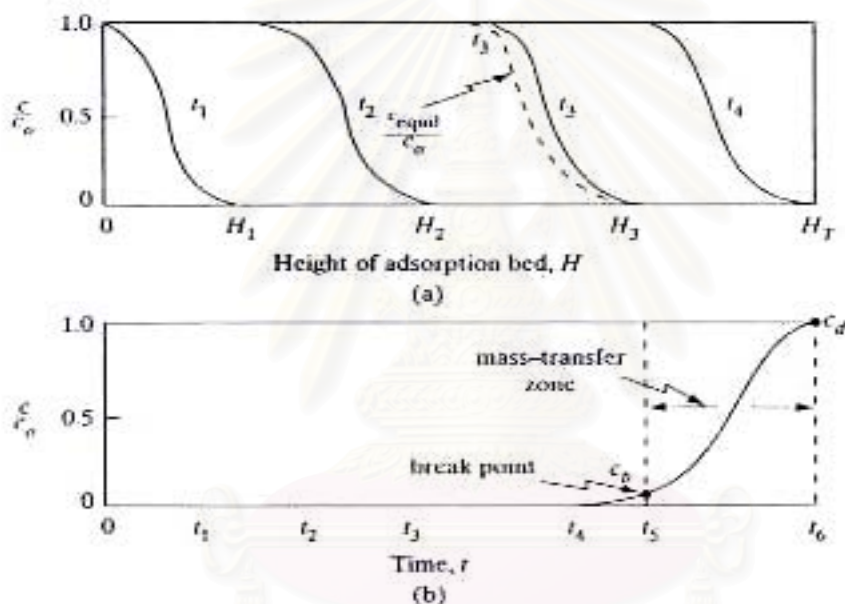
2.11.4.2 การทำงานแบบคอลัมน์ (Column process)

ใช้ในการศึกษาในระดับห้องปฏิบัติการ เพื่อหาค่าความสามารถในการแลกเปลี่ยนไอออนและสภาวะที่เหมาะสมของคอลัมน์ บรรจุเรซินลงคอลัมน์แล้วผ่านสารละลายเข้าคอลัมน์ที่อัตราการไหลคงที่ ภาวะของการทำงานแบบคอลัมน์จะมีความซับซ้อนมากกว่าแบบทซ์ความเข้มข้นของตัวถูกละลายที่ถูกดูดซับบนเรซินจะมีการเปลี่ยนแปลงและมีตำแหน่งที่เปลี่ยนไปในคอลัมน์ตามระยะเวลาของการดูดซับ ดังรูปที่ 2.4 เริ่มต้นพบว่าไม่มีความเข้มข้นของตัวถูกละลายบนเรซินแต่เมื่อทำการผ่านสารละลายเข้าคอลัมน์ ตำแหน่งแรกของการสัมผัสระหว่างสารละลายกับเรซินจะเริ่มเกิดการดูดซับ (adsorption) ทันที เมื่อสารละลายไหลผ่านคอลัมน์และทำการเก็บสารละลายเป็นลำดับส่วนจะพบว่าความเข้มข้นของสารละลายบริเวณด้านล่างของคอลัมน์จะมีค่าเท่ากับศูนย์ ได้ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายที่เวลา t_1 เมื่อเขียนความสัมพันธ์ระหว่างค่า c/c_0 และความยาวคอลัมน์หรือเวลา (เมื่อ c_0 คือความเข้มข้นเริ่มต้นของสารละลาย และ c คือความเข้มข้นของสารละลายที่ตำแหน่งใดๆ ในคอลัมน์) ดังรูปที่ 2.4 (a) เมื่อเวลาผ่านไปจะเกิดการดูดซับ (adsorption) ห่างจากด้านบนคอลัมน์ เช่น ที่เวลา t_2 ความเข้มข้นสารละลายมีการเปลี่ยนแปลงและเคลื่อนตามความยาวคอลัมน์ และเรซินจะอิมตัวด้วยตัวถูกละลาย และมีค่าคงที่ เส้นประบริเวณ t_3 แสดงถึงสมมูลระหว่างความเข้มข้นของตัวถูกละลายในสารละลายกับเรซิน

พิจารณาจากรูปที่ 2.4 (b) ที่เวลา t_4 ความเข้มข้นของสารละลายด้านล่างคอลัมน์ก็ยังคงมีค่าเท่ากับศูนย์ต่อมาที่เวลา t_5 พบว่าความเข้มข้นของสารละลายจะเพิ่มสูงขึ้น และสังเกตเห็นจุดที่เรียกว่า break point เรียกความเข้มข้น ณ จุดนี้ว่า c_b หลังจากจุดนี้ไปแล้วความ

เข้มข้นจะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆจนถึงจุดที่เรียกว่า c_d ซึ่งเป็นจุดสุดท้ายของ breakthrough curve แสดงให้เห็นว่าคอลัมน์ไม่มีความสามารถในการแลกเปลี่ยนไอออนแล้ว ลักษณะของ breakthrough curve ที่ดีควรจะแคบและมีความชันซึ่งแสดงถึงความสามารถในการแลกเปลี่ยนไอออนของคอลัมน์ที่จุด break point และประสิทธิภาพของเรซินในการแลกเปลี่ยนไอออน ซึ่งนำมาพิจารณาถึงการใช้ภาวะที่เหมาะสมในการแยกไอออนจะช่วยลดพลังงานและค่าใช้จ่ายในขั้นตอนการแยก

การทำงานแบบคอลัมน์สามารถทำแบบต่อเนื่องได้โดยบรรจุเรซินในคอลัมน์และปล่อยสารละลายที่ต้องการแยกสารไหลผ่านชั้นเรซินอย่างต่อเนื่องทำให้การแลกเปลี่ยนไอออนเกิดขึ้นตลอดเวลาเมื่อใช้งานไปนานๆ เรซินจะหมดประสิทธิภาพ (Exhausted resin) จะต้องฟื้นฟูประสิทธิภาพ (regeneration) โดยใช้สารละลายกรดหรือด่าง ขึ้นกับชนิดของเรซิน (Geankoplis, 1993)



รูปที่ 2.4 ความเข้มข้นของตัวถูกละลายในการดูดซับในคอลัมน์ (a) ค่า c/c_0 ที่ตำแหน่งและเวลาต่างๆของการดูดซับในคอลัมน์ (b) breakthrough curve ของสารละลาย

2.12 การประยุกต์ใช้การแลกเปลี่ยนไอออนในกระบวนการหมัก

การแลกเปลี่ยนไอออนโดยการดูดซับบนเรซิน เป็นวิธีที่นิยมใช้ในระดับอุตสาหกรรมเพราะทำได้ง่าย ประหยัดและลดค่าใช้จ่ายในกระบวนการผลิต (Cao และคณะ, 2002) เป็นอีกวิธีที่ถูกนำมาศึกษาในระดับห้องปฏิบัติการ โดยนำคอลัมน์แลกเปลี่ยนไอออนมาแยกแอลกอฮอล์ออกจากน้ำหมัก (Pitt และคณะ, 1983) เพื่อพัฒนากระบวนการแยกและลดพลังงานในกระบวนการผลิต พบว่าในขั้นตอนการดูดซับ (adsorption) และขั้นตอนการฟื้นฟูประสิทธิภาพ

คอลัมน์ (regeneration) ใช้ระยะเวลาเพียง 1 ชั่วโมงต่อรอบ เมื่อเปรียบเทียบพลังงานที่ใช้ในการแยก แอลกอฮอล์พบว่า การแยกด้วยเรซินใช้พลังงานเพียง 16 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่วิธีการแยกเดิมใช้พลังงานถึง 30-60 เปอร์เซ็นต์ของพลังงานทั้งหมด

มีการศึกษาแยกกรดอินทรีย์ออกจากน้ำหมักโดยวิธีการดูดซับบนเรซิน เช่น ศึกษาแยกกรดแลคติก (L(+)-lactic acid) ออกจากน้ำหมักด้วยเรซิน Amberlite IRA-400 และศึกษาสมบัติของเรซิน เช่น adsorption isotherm, breakthrough curve ที่พีเอช 5.00 และ 2.00 และความสามารถในการดูดซับสูงสุด (q_m) การแยกกรดแลคติกในระดับขดเขย่าพบว่าภาวะที่เหมาะสมในการแยกคือที่พีเอช 5.00 ให้ลักษณะ isotherm แบบ Langmuir และ ค่า q_m เท่ากับ 222.46 มิลลิกรัมต่อกรัมเรซิน และการแยกด้วยคอลัมน์แลกเปลี่ยนไอออนภาวะที่เหมาะสมคือที่พีเอช 2.00 จาก breakthrough curve ให้ค่า q_m เท่ากับ 106.0 มิลลิกรัมต่อกรัมเรซิน ขั้นตอนการชะเพื่อให้ได้กรดแลคติก ตัวชะที่เหมาะสมคือ น้ำกลั่น และให้เปอร์เซ็นต์ของผลผลิตที่แยกได้สูงถึง 92.11 เปอร์เซ็นต์ จากผลการทดลองได้ว่าวิธีการนี้เป็นวิธีการที่ประหยัด เพราะในขั้นตอนการชะตัวชะที่ใช้คือน้ำกลั่น และยังมีความเป็นไปได้ที่จะนำไปใช้แยกผลผลิตควบคู่กับการหมักแบบต่อเนื่อง (Cao และคณะ, 2002) และมีการศึกษาแยกกรดแลคติก (L(+)-lactic acid) ออกจากน้ำหมักด้วยคอลัมน์แลกเปลี่ยนไอออนลบ Amberlite IRA-92 โดยแปรปัจจัยในการแยกกรดแลคติก เช่น อัตราการไหล ปริมาตรสารละลาย พีเอชของสารละลาย เพื่อให้ได้ค่าบริสุทธิ์และอัตราการแยกกรดเพิ่มขึ้น ในขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์พบว่าพีเอชของสารละลายช่วง 5.00 ถึง 6.00 ที่อัตราการไหลต่ำๆ ให้ผลผลิต และอัตราการผลิตเท่ากับ 82.6 เปอร์เซ็นต์ และ 1.16 กรัมต่อกรัมเรซินต่อวันตามลำดับ (Tong และคณะ, 2004)

ในกระบวนการหมักด้วยจุลินทรีย์แบบแบทช์ เมื่อระยะเวลาในการหมักผ่านไปจะเกิดการสะสมผลิตภัณฑ์และเป็นผลให้เกิดปฏิกิริยาการยับยั้งการผลิตจากการสะสมของผลผลิต ทำให้ผลผลิตที่ได้ลดลง จึงมีการพัฒนากระบวนการผลิตโดยนำการหมักควบคู่กับการแยก (Extractive fermentation) มาใช้เพื่อนำมาลดปฏิกิริยาการยับยั้งการผลิตจากการสะสมของผลผลิตและเพื่อให้กระบวนการแยกมีประสิทธิภาพมากขึ้น วิธีการแยกที่ถูกนำมาใช้ควบคู่กับการหมักก็คือการดูดซับด้วยเรซินแลกเปลี่ยนไอออน ได้นำมาศึกษาการผลิตเม็ดสีควบคู่การแยกโดยเรซิน HP-20 พบว่า ที่ปริมาณเรซินเท่ากับ 10 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ให้อัตราการผลิตเม็ดสีสูงสุดเท่ากับ 6.92 กรัมต่อลิตร ได้อัตราการผลิตเพิ่มขึ้นเท่ากับ 31 เปอร์เซ็นต์ (Kim และคณะ, 1999) ในการผลิตกรดมะนาวได้นำวิธีการดังกล่าวมาใช้โดยศึกษาการผลิตกรดมะนาวด้วยเชื้อรา *A. niger* ผ่านน้ำหมักจากถังหมักไปยังคอลัมน์แลกเปลี่ยนไอออนลบและแยกกรดมะนาวออกจากน้ำหมักในขณะผลิต พบว่าได้ผลผลิตเพิ่มขึ้นจาก 0.338 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง เป็น 0.543 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และลดเวลาการหมักจาก 8 วันเหลือเพียง 6 วัน (Jianlong และคณะ, 2000)

บทที่ 3

วิธีการทดลอง

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 อุปกรณ์

เครื่องกำเนิดคลื่นอัลตราโซนิค (sonicator) รุ่น Ultrasonic Cleaner D 200 ยี่ห้อ Delta ของบริษัท D.S.C. group ประเทศไต้หวัน

เครื่องเขย่าผสม (vortex mixer) รุ่น K-550-GE ของบริษัท Scientific Industries, Inc. ประเทศสหรัฐอเมริกา

เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิแบบหมุน (rotary incubator shaker) รุ่น G-25 ของบริษัท New Brunswick scientific Co., Inc. ประเทศสหรัฐอเมริกา

เครื่องชั่งแบบละเอียด (electronic balance) รุ่น FX-180 ของบริษัท A&D ประเทศญี่ปุ่น

เครื่องชั่งแบบหยาบ (electronic balance) รุ่น FX-3000 ของบริษัท A&D ประเทศญี่ปุ่น

เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) รุ่น KR-20000T ของบริษัท Kubota Corporation ประเทศญี่ปุ่น

เครื่องเพอริสโตลติกปั๊ม รุ่น 7554-20 ยี่ห้อ Masterflex ของบริษัท Cole Parmer Instrument Co., Ltd. ประเทศสหรัฐอเมริกา และรุ่น CH2A#459 ของบริษัท Amicon Co., Ltd. ประเทศสหรัฐอเมริกา

เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น Spectronic 21 ของบริษัท Bausch&Lomb ประเทศสหรัฐอเมริกา

เครื่องไฮเพอร์ฟอแมนซ์ลิกวิดโครมาโตกราฟี (HPLC) รุ่น LC-8A ชุดควบคุมระบบ SLC-8A และเครื่องวิเคราะห์ผล C-R4A Chromatopac ของบริษัท Shimadzu Corporation ประเทศญี่ปุ่น

ตู้อบเชื้อควบคุมอุณหภูมิ (incubator) รุ่น MIR 152 ของบริษัท Sanyo Electronic Co., Ltd. ประเทศญี่ปุ่น

ตู้ปลอดเชื้อ (laminar flow hood) รุ่น NK System Clean Bench ประเทศญี่ปุ่น

ตู้อบเชื้อแบบแห้ง (hot air oven) รุ่น 94788 ของบริษัท Contherm Scientific Ltd. ประเทศนิวซีแลนด์

ตู้อบไมโครเวฟ รุ่น MR-6650 ของบริษัท Hitachi Ltd. ประเทศญี่ปุ่น

ตู้อบแห้ง (oven) รุ่น UL-80 บริษัท Memmert ประเทศเยอรมัน

ถังหมัก (fermentor) ขนาด 5 ลิตร รุ่น MD-300-5L ใบพัดแบบกังหัน 6 ใบ (6-blade turbine) เครื่องควบคุมภาวะ (Bioprocess controller) รุ่น MDIAC-SS ของบริษัท Marubishi ประเทศญี่ปุ่น เครื่องอัดอากาศ (Air compressor) ของบริษัท Hitachi ประเทศญี่ปุ่น เครื่องควบคุมระบบน้ำหล่อเย็น (Circulation type hardy cooler) รุ่น TRL-108 ของบริษัท Thomas Kagaka ประเทศญี่ปุ่น

ถังหมัก (fermentor) ขนาด 2 ลิตร รุ่น BIOSTAT Bplus ของบริษัท Sartorius ใบพัด 3 ใบ (3-blade segment impellers) ควบคุมการทำงานด้วย Digital controller สามารถป้อนโปรแกรมผ่านหน้าจอแบบสัมผัส (Touch Screen Technology)

มาตรวัดความเป็นกรดต่าง (pH meter) รุ่น F-13 ของประเทศญี่ปุ่น และมาตรวัดความเป็นกรดต่าง (pH Combination Electrode) สำหรับถังหมักขนาด 5 ลิตร รุ่น D-26 ของบริษัท TOA Electronics, Ltd. ประเทศญี่ปุ่น

หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำ (autoclave) รุ่น KT-30 SD ของบริษัท ALP Co., Ltd. ประเทศญี่ปุ่น

3.1.2 สารเคมี

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต	ประเทศ	เกรด
กรดซัลฟูริก	MERCK	เยอรมัน	Lab
กรดไดโนโตรซาลิไซลิก	FLUKA	สวิสเซอร์แลนด์	Analytical
กรดฟอสฟอริก	CARLO ERBA	อิตาลี	Analytical
กรดมะนาว	วิทยาสรม	ไทย	Commercial
กรดมะนาวชนิดปราศจากน้ำ	SIGMA	สหรัฐอเมริกา	Analytical
กรดไอโซซิดริก	SIGMA	สหรัฐอเมริกา	Analytical
กรดทาร์ทาริก	SIGMA	สหรัฐอเมริกา	Analytical
แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต	MERCK	เยอรมัน	Lab
โซเดียมไฮดรอกไซด์	MERCK	เยอรมัน	Lab
เดรกซ์โทรส (กลูโคส)	สงวนชัยเคมี	ไทย	Commercial
ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	MERCK	เยอรมัน	Lab
โพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	MERCK	เยอรมัน	Lab
เปปโตน	DIFCO	สหรัฐอเมริกา	Lab
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต	FLUKA	สวิสเซอร์แลนด์	Lab
แมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรต	MERCK	เยอรมัน	Lab

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต	ประเทศ	เกรด
สารสกัดจากยีสต์	IBGE	ไทย	Lab
สารสกัดจากมอลต์	DIFCO	สหรัฐอเมริกา	Lab
วุ้นผง	พัฒนสินเอ็นเตอร์ไพรส์	ไทย	Commercial
อัลจินต	SIGMA	สหรัฐอเมริกา	Lab
เอทานอล 95%	กรมสรรพสามิต	ไทย	Commercial
แอมโมเนียมคลอไรด์	FLUKA	สวิสเซอร์แลนด์	Lab

หมายเหตุ IBGE = สถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2 เชื้อจุลินทรีย์

เชื้อยีสต์ *Candida oleophila* สายพันธุ์ NNU-62

3.3 การเก็บรักษาเชื้อ

เก็บเชื้อโดยใช้เข็มเก็บเชื้อแล้วตากบนอาหารแข็งลาดเอียง (agar slant) สูตรอาหาร YM (ภาคผนวก ก.1) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เก็บในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส

3.4 การเลี้ยงเชื้อและการผลิตกรดมะนาว

3.4.1 การเตรียมหัวเชื้อในขวดเขย่า

เลี้ยงยีสต์บนอาหารแข็งลาดเอียง บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อลงในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ (ภาคผนวก ก.1) เติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาตร 2.5 มิลลิลิตรต่อหลอดอาหารแข็งลาดเอียง ปิเปตเซลล์แขวนลอยปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรลงในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อในขวดรูปชมพูนขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่า ควบคุมการหมักที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

3.4.2 การเตรียมหัวเชื้อในถังหมักขนาด 5 ลิตร

ถ่ายหัวเชื้อที่เตรียมได้จากข้อ 3.4.1 ปริมาตร 300 มิลลิลิตร ลงในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่มีปริมาตรอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ (ภาคผนวก ก.1) ปริมาตร 2.7 ลิตร ควบคุมการหมักที่อุณหภูมิ

28 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 300 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที เป็นเวลา 9 ชั่วโมง

3.4.3 การเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 5 ลิตร

ถ่ายหัวเชื้อที่เตรียมได้จากข้อ 3.4.1 ปริมาตร 300 มิลลิลิตร ลงในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่มีปริมาตรอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาว (ภาคผนวก ก.2) ปริมาตร 2.7 ลิตร ควบคุมการหมักที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที ควบคุมค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 5.00 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 40 อัตราการให้อากาศ 1 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที เป็นเวลา 120 ชั่วโมง

3.4.4 การเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 2 ลิตร

ถ่ายหัวเชื้อที่เตรียมได้จากข้อ 3.4.1 ปริมาตร 150 มิลลิลิตร ลงในถังหมักขนาด 2 ลิตรที่มีปริมาตรอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาว (ภาคผนวก ก.2) ปริมาตร 1.35 ลิตร ควบคุมการหมักที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที ควบคุมค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 5.00 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 40 อัตราการให้อากาศ 1 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที เป็นเวลา 120 ชั่วโมง

3.5 การตรึงเซลล์ *C. oleophila* NNU-62 เพื่อผลิตกรดมะนาว

เลี้ยงยีสต์ตามวิธีข้อ 3.4.2 นำเซลล์แขวนลอยมาปั่นแยกเซลล์ด้วยเครื่องปั่นแยกความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แยกส่วนใสทิ้ง ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง เก็บเซลล์ไว้ทำการตรึงเซลล์

3.5.1 การตรึงเซลล์ด้วยแคลเซียมอัลจิเนต

ผสมเซลล์ยีสต์ประมาณ 8.15 กรัม (น้ำหนักเซลล์แห้ง) ต่อลิตร ปริมาตร 75 มิลลิลิตร ในสารละลายโซเดียมอัลจิเนตความเข้มข้นร้อยละ 4 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 75 มิลลิลิตร แล้วหยดลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ กวนเบาๆ ล้างเซลล์ตรึงด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ เซลล์ตรึงที่ได้จะมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2 มิลลิเมตร เก็บเซลล์ตรึงเพื่อนำไปผลิตกรดมะนาว

3.5.2 การผลิตกรดมะนาวด้วยเซลล์ตรึง *C. oleophila* NNU-62 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

ถ่ายเซลล์ตรึงที่เตรียมได้จากวิธีข้อ 3.5.1 ลงในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตกรดมะนาว (ภาคผนวก ก.2) ปริมาตรเริ่มต้น 3.0 ลิตร กวนผสมที่ความเร็วรอบ 50 รอบต่อนาทีและควบคุมภาวะการหมักที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส อัตราการให้อากาศ 1.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที ควบคุมค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 5.0 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้นร้อยละ 40 (น้ำหนักต่อปริมาตร)

3.5.3 การผลิตกรดมะนาวด้วยเซลล์ตรึง *C. oleophila* NNU-62 ในถังหมักแบบฟลูอิดไดซ์เบด

ถ่ายเซลล์ตรึงที่เตรียมได้จากวิธีข้อ 3.5.1 ลงในถังหมักแบบฟลูอิดไดซ์เบด ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตกรดมะนาว (ภาคผนวก ก.2) ปริมาตรเริ่มต้น 2.0 ลิตร ควบคุมการหมักที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที ควบคุมค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 5.00 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 40 (น้ำหนักต่อปริมาตร)

3.6 การศึกษาสมบัติของเรซินแลกเปลี่ยนไอออนที่จะนำไปใช้ในการแยกกรดมะนาว

3.6.1 เวลาที่สมดุลของเรซินในการดูดซับกรดมะนาว

กรองเรซินแล้วถ่ายลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร เทสารละลายกรดมะนาว ความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตรที่ปรับค่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้นด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ลงในขวดบรรจุเรซินเขย่าที่ความเร็วรอบ 300 รอบต่อนาที เริ่มจับเวลา เก็บตัวอย่างทุกๆ 1 ชั่วโมง เป็นเวลา 5 ชั่วโมง วิเคราะห์ปริมาณกรดมะนาวด้วย HPLC เปรียบเทียบเวลาที่สมดุลของเรซินในการดูดซับกรดมะนาวกับปริมาณกรดมะนาวที่ถูกดูดซับบนเรซิน 3 ชนิด ได้แก่ Dowex 1x4-400 Dowex Marathon WBA และ Amberlite XAD-7 และแปรค่าความเป็นกรดต่างของสารละลายกรดมะนาว ดังนี้ ชุดควบคุม (ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 1.90) และชุดทดลอง (ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 2.00, 3.00, 4.00, 5.00 และ 6.00) คัดเลือกเรซินที่สามารถดูดซับกรดมะนาวได้มากที่สุดที่เวลาสมดุลของเรซิน

3.6.2 ศึกษา ion exchange isotherm

นำเรซินที่คัดเลือกจากข้อ 3.6.1 มาศึกษา ion exchange isotherm โดยเตรียมสารละลายกรดมะนาวที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 0 ถึง 100 กรัมต่อลิตร ปรับค่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้นเท่ากับ 5.00 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ ถ่ายเรซิน 1.0 กรัม ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร เติมสารละลายกรด

มะนาวแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 25 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างสารละลายกรดมะนาว วิเคราะห์ปริมาณกรดมะนาวด้วย HPLC กำหนดความเข้มข้นกรดมะนาวที่สมดุลและปริมาณกรดมะนาวที่ถูกดูดซับต่อกรัมเรซิน แปรลักษณะของสารละลายกรดมะนาว ได้แก่ สารละลายกรดมะนาวเกรดทางการค้า ที่ปรับค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 5.00 และกรดมะนาวที่มีใน production medium ที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 5.00

Ion exchange isotherm จะแสดงถึงค่าความสามารถในการดูดซับกรดมะนาวของเรซินซึ่งจะนำไปใช้กำหนดหาปริมาณเรซินที่เหมาะสมในการแยกกรดมะนาวด้วยคอลัมน์แลกเปลี่ยนไอออนต่อไป

3.7 การหาภาวะที่เหมาะสมในการแยกกรดมะนาวด้วยคอลัมน์แลกเปลี่ยนไอออน

3.7.1 การเตรียมเรซินแลกเปลี่ยนไอออน

เตรียมเรซินแลกเปลี่ยนไอออนลบ Dowex Marathon WBA ให้มีแคตไอออน (counter ion) อยู่ในรูปของไฮดรอกไซด์ไอออน (OH⁻) โดยถ่ายเรซินปริมาณ 15 กรัม ลงคอลัมน์แลกเปลี่ยนไอออน ผ่านสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 2 โมลาร์ ปริมาตร 250 มิลลิลิตร จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นจนน้ำล้างเรซินมีสภาพเป็นกลาง

3.7.2 คอลัมน์แลกเปลี่ยนไอออน

คอลัมน์แก้ว 2 ชั้น ชั้นในมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 0.8 เซนติเมตร ความยาว 40 เซนติเมตร บรรจุเรซินแลกเปลี่ยนไอออนลบ Dowex Marathon WBA ปริมาณ 15 กรัม มีปริมาตรว่างระหว่างเรซิน (void volume) 4.0 มิลลิลิตร

ปริมาตรว่างระหว่างเรซิน (void volume) ได้จากการวัดปริมาตรน้ำที่อยู่ระหว่างอนุภาคของเรซิน โดยบรรจุเรซิน 15 กรัม ลงคอลัมน์ เติมน้ำกลั่นให้เต็มคอลัมน์ แล้วปล่อยให้ น้ำไหลออกจากคอลัมน์จนคอลัมน์แห้ง

3.7.3 ขั้นตอนการดูดซับ

แปรปัจจัย ได้แก่ อัตราการไหลของสารละลาย และลักษณะของสารละลายกรดมะนาว ที่ผ่านเข้าคอลัมน์ เพื่อหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการดูดซับกรดมะนาวของคอลัมน์

3.7.3.1 อัตราการไหลของสารละลาย

3.7.3.1.1 เวลาที่สมดุลของเรซินในการดูดซับกรดมะนาว

ทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.6.1 โดยถ่ายเรซิน Dowex Marathon WBA

ปริมาณ 1.0 กรัม เติมสารละลายกรดมะนาวความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร ปรับค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 5.00 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ เก็บตัวอย่างทุกๆ 10 นาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง วิเคราะห์ปริมาณกรดมะนาวที่เหลืออยู่ในสารละลายด้วยวิธี HPLC เวลาที่สมดุลของเรซินจะนำไปใช้เป็นข้อมูลในการหาอัตราการไหลเบื้องต้นสำหรับการดูดซับกรดมะนาวของคอลัมน์แลกเปลี่ยนไอออนต่อไป

3.7.3.1.2 สารละลายกรดมะนาวที่ผ่านเข้าคอลัมน์แลกเปลี่ยนไอออน

3.7.3.1.2.1 นำหมักของกรดมะนาว ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 5.30 ทำการกรองน้ำหมักผ่านกระดาษกรอง GF/C (very fine glass microfiber filter) แล้วผ่านสารละลายกรดมะนาวเข้าคอลัมน์บรรจุเรซินด้วยอัตราการไหลที่เหมาะสม

3.7.3.1.2.2 สารละลายกรดมะนาวกรดทางการค้า ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 5.00 ละลายกรดมะนาวความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตรในน้ำกลั่นแล้วผ่านเข้าคอลัมน์บรรจุเรซินด้วยอัตราการไหลที่เหมาะสม

3.7.3.1.3 อัตราการไหลที่เหมาะสมในการดูดซับของคอลัมน์แลกเปลี่ยนไอออน

ผ่านสารละลายกรดมะนาวเข้าคอลัมน์ด้วยอัตราการไหลเท่ากับ 3.75 และ 7.5 มิลลิลิตรต่อชั่วโมงต่อปริมาตรว่างระหว่างเรซิน เก็บสารที่ผ่านออกจากคอลัมน์เป็นลำดับส่วนนำมาวิเคราะห์ปริมาณกรดมะนาวด้วย HPLC คำนวณหาอัตราส่วนของปริมาณกรดมะนาวที่ผ่านออกจากคอลัมน์ต่อกรดมะนาวเริ่มต้น เขียนกราฟ breakthrough curve เพื่อเปรียบเทียบหาอัตราการไหลที่เหมาะสม

3.7.4 ขั้นตอนการชะ

ตัวชะที่ใช้ คือ กรดซัลฟูริก แปรความเข้มข้นของกรดซัลฟูริก

3.7.4.1 เวลาที่สมดุลของการชะกรดมะนาวออกจากเรซินด้วยกรดซัลฟูริก

เตรียมเรซินที่ดูดซับกรดมะนาว โดยทดลองเช่นเดียวกับการทดลองที่ 3.6.1 เขย่าด้วยอัตราเร็ว 300 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 12 ชั่วโมง กรองแยกเรซินแล้วล้างเรซินด้วยน้ำกลั่นเพื่อล้างกรดมะนาวที่ไม่ถูกดูดซับแล้วกรองแยกน้ำกลั่นออก ถ่ายเรซินลงขวดรูปชมพู่ เติมสารละลายกรดซัลฟูริก แปรความเข้มข้นเท่ากับ 0.25, 0.50, 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5 โมลาร์ ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ที่บรรจุเรซิน เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที เริ่มจับเวลา เก็บตัวอย่างทุก ๆ 1 ชั่วโมง เป็นเวลา 5 ชั่วโมง กรองแยกเรซินออก นำสารละลายไปวิเคราะห์หาปริมาณกรดมะนาวด้วย HPLC เขียนกราฟระหว่างปริมาณกรดมะนาวที่ชะได้กับระยะเวลาในการชะเพื่อหาเวลาที่สมดุลของการชะ

3.8 การผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 2 ลิตรด้วยระบบ perfusion โดยใช้ spinfilter ควบคู่กับการแยกด้วยคอลัมน์แลกเปลี่ยนไอออน

ก่อนการใช้คอลัมน์แลกเปลี่ยนประจุลบทำการฆ่าเชื้อโดยผ่านแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ผ่านคอลัมน์ แล้วล้างตามด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว สำหรับการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 2 ลิตร ตามวิธีข้อ 3.4.4 ควบคุมค่าความเป็นกรดต่างในช่วงก่อนการทำงานของระบบแลกเปลี่ยนไอออนโดยป้อนสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ร้อยละ 40 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เข้าไปในถังหมัก เมื่อทำการหมักถึงชั่วโมงที่ 24 หยุดป้อนสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นร้อยละ 40 (น้ำหนักต่อปริมาตร) และดึงน้ำหมักออกจากถังหมักผ่าน spinfilter ที่มีขนาดรูพรุนเท่ากับ 20 ไมโครเมตร ผ่านน้ำหมักเข้าคอลัมน์แลกเปลี่ยนประจุลบแล้วเวียนน้ำหมักกลับเข้าถังหมัก เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง วิเคราะห์ปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซिटริก และ น้ำตาลกลูโคสที่เหลือ

3.9 วิธีการวิเคราะห์

3.9.1 วัดการเจริญของเชื้อโดยวิธีหาน้ำหนักเซลล์แห้ง

เปิดน้ำหมักปริมาตร 10.0 มิลลิลิตร กรองผ่านกระดาษกรอง Whatman GF/C ที่ทราบน้ำหนักแห้งแน่นอน โดยใช้เครื่องกรองอย่างละเอียด (Millipore filter) และเครื่องสูญญากาศ ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 20.0 มิลลิลิตร นำกระดาษกรองที่มีเซลล์ไปอบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นในเดสิเคเตอร์แล้วชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งละเอียด หักน้ำหนักกระดาษกรองออกจะได้น้ำหนักเซลล์แห้งหน่วยเป็นกรัมต่อลิตร ส่วนสารละลายกรดมะนาว นำไปวิเคราะห์หาปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิทริก และน้ำตาลกลูโคสที่เหลือ

3.9.2 การวิเคราะห์หาปริมาณกรดมะนาวโดยใช้เครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิกวิดโครมาโตกราฟี (HPLC)

เปิดสารละลายตัวอย่างปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง เติมสารละลายตัวพาปริมาตร 9.0 มิลลิลิตร แล้วเติมสารมาตรฐานเปรียบเทียบภายในปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน กรองผ่านกระดาษกรองเซลลูโลสอะซิเตท นิดสารละลายตัวอย่างปริมาตร 10 ไมโครลิตรเข้าเครื่อง HPLC โดยมีภาวะดังนี้

คอลัมน์	: Selectosil 5 C18 ขนาด (I.D.) 4.6 มิลลิเมตร ยาว 25 เซนติเมตร
สารละลายตัวพา	: ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต $[(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4]$ 5 กรัมต่อลิตร ในน้ำที่ปราศจากไอออน แล้วปรับค่าความเป็นกรด ค่าเท่ากับ 2.00 ด้วยกรดฟอสฟอริก
สารมาตรฐานเปรียบเทียบ	: กรดทาร์ทาริก ความเข้มข้น 80 กรัมต่อลิตร ในน้ำปราศจาก ไอออน
อุณหภูมิที่ใช้	: 40 องศาเซลเซียส
อัตราการไหล	: 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที
เครื่องตรวจวัด	: สเปกโตรมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 214 นาโนเมตร

เวลาที่อยู่ในคอลัมน์ (retention time) ของกรดมะนาวประมาณ 5.6 นาที และกรดไอโซซีตริกประมาณ 3.8 นาที คำนวณหาปริมาณกรดมะนาว และกรดไอโซซีตริก จากกราฟมาตรฐานกรดมะนาวในช่วงความเข้มข้น 0.0-5.0 กรัมต่อลิตร และกราฟมาตรฐานของกรดไอโซซีตริกในช่วงความเข้มข้น 0.0-1.0 กรัมต่อลิตร กราฟมาตรฐานเป็นกราฟระหว่างความเข้มข้นของกรดมะนาวหรือกรดไอโซซีตริกกับอัตราส่วนของพื้นที่ใต้กราฟของกรดต่อสารละลายมาตรฐานเปรียบเทียบภายใน (ภาคผนวก ค.1 และ ภาคผนวก ค.2) หน่วยกรัมต่อลิตร

3.9.3 การวิเคราะห์หาปริมาณกลูโคสที่เหลือ (Bernfeld, 1955)

เปิดสารละลายตัวอย่างที่เจือจางที่เหมาะสม ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง เติมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก 1.0 มิลลิลิตร (ภาคผนวก ข.2) ผสมให้เข้ากัน ปิดฝาหลอดทดลอง นำไปต้มในอ่างน้ำเดือด 5 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นในอ่างน้ำแข็ง 5 นาที เติมน้ำที่ปราศจากไอออน ปริมาตร 10.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ใช้น้ำปราศจากไอออนเป็นตัวเปรียบเทียบ คำนวณหาปริมาณกลูโคสที่เหลือได้จากกราฟมาตรฐานของกลูโคส ในช่วงความเข้มข้น 0.0-2.0 กรัมต่อลิตร (ภาคผนวก ค.3) หน่วยเป็นกรัมต่อลิตร

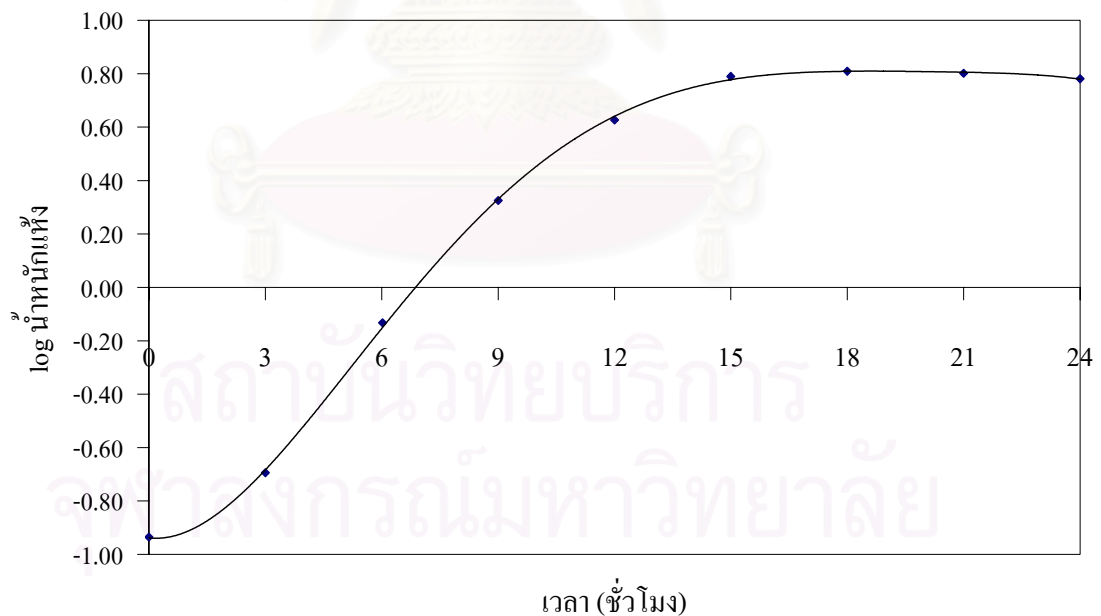
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

ผลการทดลอง และอภิปรายผล

4.1 รูปแบบการเจริญของเชื้อ *C. oleophila* NNU-62 ในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อในขวดเขย่า

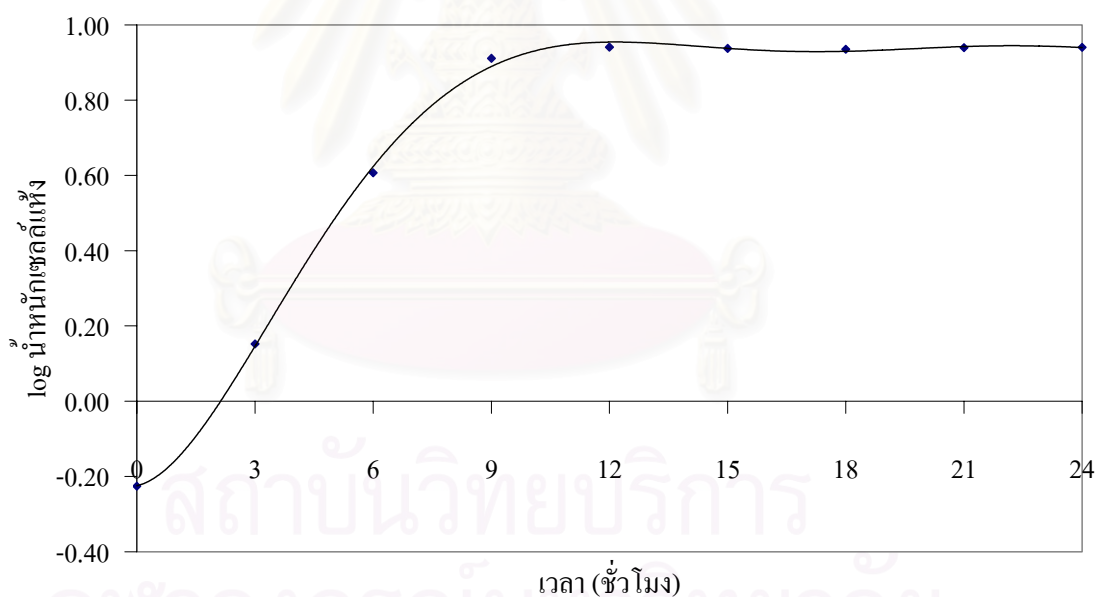
ศึกษาการเจริญของเชื้อ *C. oleophila* NNU-62 เพื่อหาอายุหัวเชื้อที่เหมาะสมโดยเลี้ยงในอาหารเหลว YM (ภาคผนวก ก.1) ตามวิธีข้อ 3.4.1 เก็บตัวอย่างทุก 3 ชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้งตามวิธีข้อ 3.9.1 ให้ผลดังตารางที่ จ.1 (ภาคผนวก จ) และ รูปที่ 4.1 พบว่าเชื้ออยู่ในระยะพักตัว (lag phase) เป็นช่วงเวลานั้นๆ และเริ่มเข้าสู่ระยะของการเจริญแบบทวิคูณ (log phase) ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 3 จนถึงชั่วโมงที่ 15 จากนั้นเซลล์จะไม่เจริญเพิ่มขึ้นอีก เมื่อพิจารณาค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะพบว่าชั่วโมงที่ 12 ให้ค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุดเท่ากับ $0.707 \text{ ชั่วโมง}^{-1}$ น้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 4.23 กรัมต่อลิตร ดังนั้นจึงเลือกใช้อายุหัวเชื้อที่ชั่วโมงที่ 12 สำหรับการเตรียมหัวเชื้อในขวดเขย่า



รูปที่ 4.1 รูปแบบการเจริญของเชื้อ *C. oleophila* NNU-62 ในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อในขวดเขย่า

4.2 รูปแบบการเจริญของเชื้อ *C. oleophila* NNU-62 ในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อในถังหมักขนาด 5 ลิตร

ศึกษาการเจริญของเชื้อ *C. oleophila* NNU-62 เพื่อหาอายุหัวเชื้อที่เหมาะสมใช้ในการตรึงเซลล์ โดยเลี้ยงในอาหารเหลว (YM medium) ตามวิธีข้อ 3.4.2 ควบคุมการหมักที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 300 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที เก็บตัวอย่างทุก 3 ชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วิเคราะห์น้ำหนักรีดเซลล์แห้งตามวิธีข้อ 3.9.1 ให้ผลดังตารางที่ 4.2 (ภาคผนวก จ) และ รูปที่ 4.2 พบว่าเชื้ออยู่ในระยะพักตัว (lag phase) เป็นช่วงเวลานิ่งๆ และเริ่มเข้าสู่ระยะของการเจริญแบบทวีคูณ (log phase) ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 3 เชื้อเจริญเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว จนถึงชั่วโมงที่ 12 จากนั้นเซลล์จะไม่มีกรเจริญเพิ่มขึ้นอีก ดังนั้นในการตรึงเซลล์ในแคลเซียมอัลจินตจึงเลือกใช้อายุหัวเชื้อชั่วโมงที่ 9 มีค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุดเท่ากับ $1.367 \text{ ชั่วโมง}^{-1}$ และน้ำหนักรีดเซลล์แห้งเท่ากับ 8.15 กรัมต่อลิตร

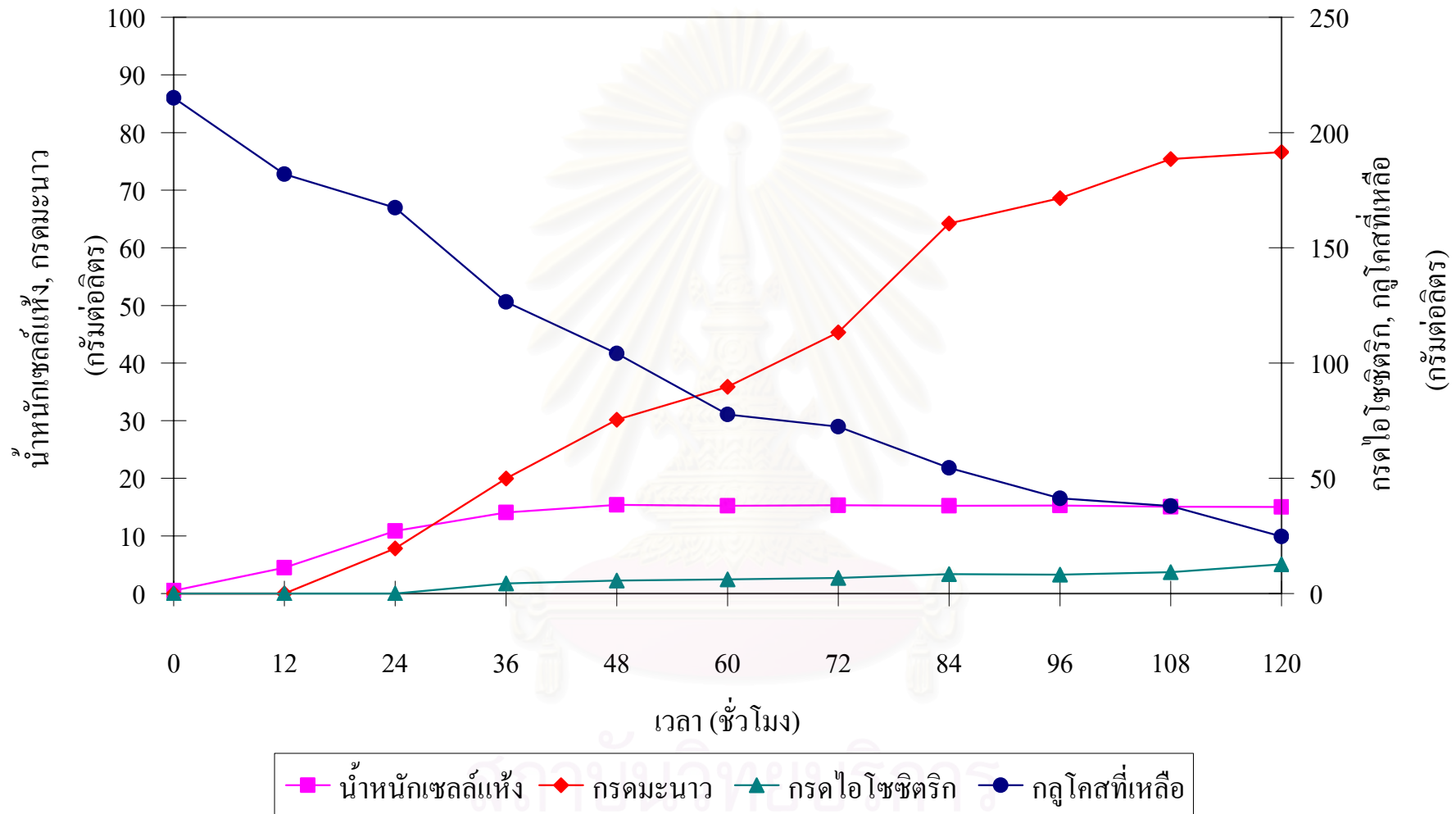


รูปที่ 4.2 รูปแบบการเจริญของเชื้อ *C. oleophila* NNU-62 ในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อในถังหมักขนาด 5 ลิตร

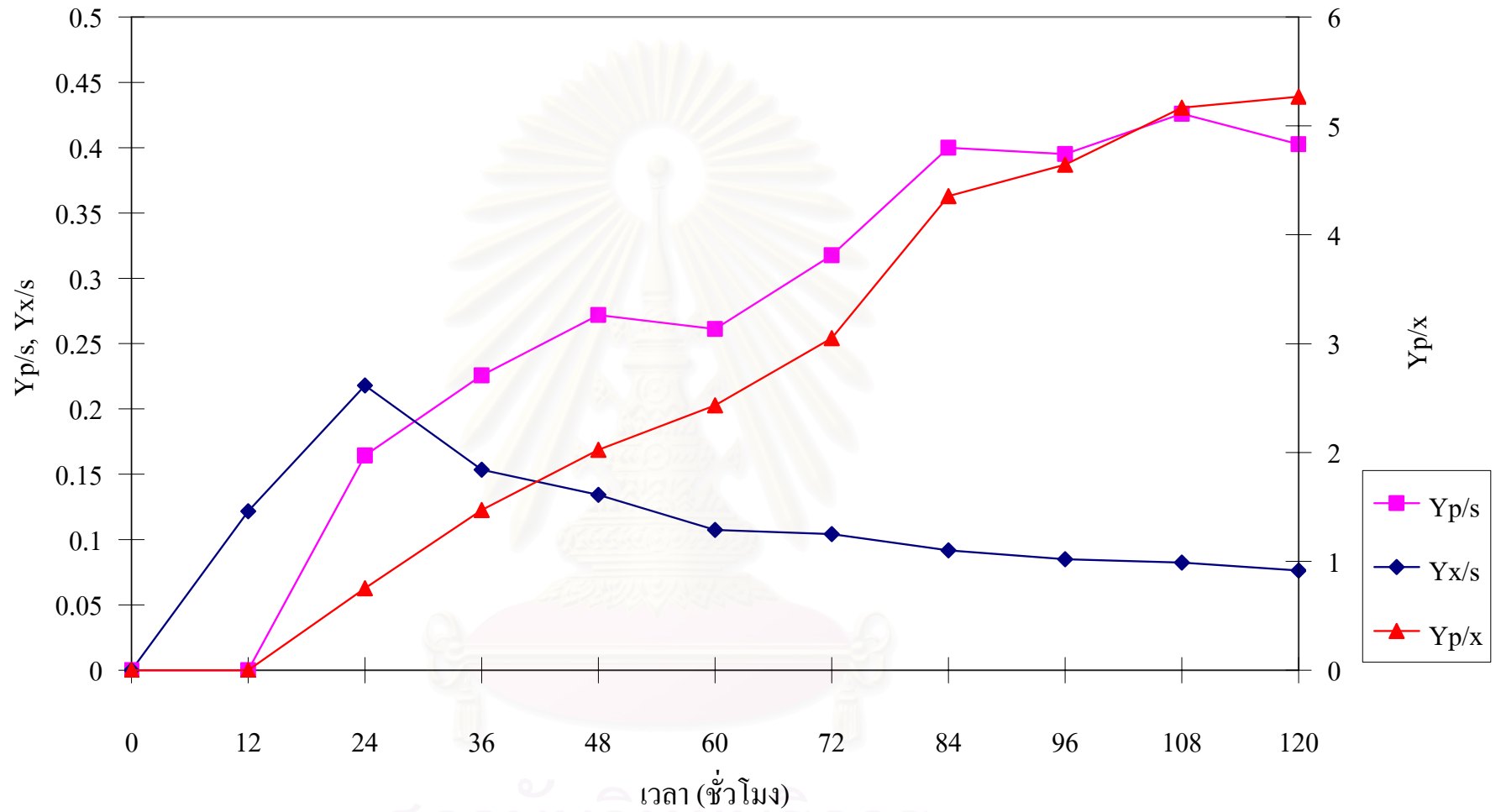
4.3 การผลิตกรดมะนาวด้วยเชื้อ *C. oleophila* NNU-62 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

เลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* NNU-62 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาว (ภาคผนวก ก.2) ตามวิธีการทดลองข้อ 3.4.3 เก็บตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมง วิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซตริก และกลูโคสที่เหลือ ให้ผลตามตารางที่ จ.3 (ภาคผนวก จ) และรูปที่ 4.3 และ 4.4 พบว่า เชื้อเจริญเพิ่มขึ้นตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 จนถึงชั่วโมงที่ 120 และมีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 48 เท่ากับ 15.38 กรัมต่อลิตร เชื้อเริ่มผลิตกรดมะนาวตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 เมื่อสิ้นสุดการหมักได้กรดมะนาว เท่ากับ 76.61 กรัมต่อลิตร เหลือปริมาณน้ำหมักในถังหมักเท่ากับ 2,200 มิลลิลิตร คิดเป็นปริมาณกรดมะนาวทั้งหมดเท่ากับ 168.54 กรัม และให้อัตราการผลิตกรดมะนาวเท่ากับ 0.638 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

จากรูปที่ 4.4 แสดงค่าการคำนวณทางจลนพลศาสตร์ตั้งแต่เริ่มต้นจนถึงที่เวลาการหมัก นั้น พบว่าความสามารถในการใช้กลูโคสในการผลิตกรดมะนาวของยีสต์ (Y_p/s) มีค่าเพิ่มขึ้นตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 จนถึงสิ้นสุดการหมัก โดยเชื้อจะใช้กลูโคสในการเจริญและผลิตกรดมะนาว ปริมาณกลูโคสในถังหมักจะลดลงในขณะที่ความเข้มข้นกรดมะนาวเพิ่มขึ้นตามลำดับจึงทำให้ค่า Y_p/s มีค่าเพิ่มขึ้น ค่าความสามารถที่ยีสต์มีกิจกรรมในการผลิตกรดมะนาว (Y_p/x) มีค่าเพิ่มขึ้นตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 เชื้อจะผลิตกรดมะนาวเมื่อใช้สารแหล่งไนโตรเจนหมดและเซลล์อยู่ในระยะเจริญคงที่ จากนั้นเซลล์จะผลิตกรดมะนาวโดยใช้กลูโคสผ่านวิถีไกลโคไลซิสเข้าสู่วัฏจักรเครปส์ได้กรดมะนาวเกิดขึ้นทำให้ค่า Y_p/x มีค่าเพิ่มขึ้นจนถึงสิ้นสุดการทดลอง สำหรับค่าความสามารถในการใช้กลูโคสในการสร้างเซลล์ (Y_x/s) มีค่าเพิ่มขึ้นตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 และมีค่าสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 24 จากนั้นค่า Y_x/s จะมีค่าลดลงจนถึงสิ้นสุดการหมัก เนื่องจากเซลล์เจริญเข้าสู่ระยะคงที่ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 แล้วไม่เจริญเพิ่มอีกแต่ยังมีความสามารถในการใช้กลูโคสเพื่อผลิตกรดมะนาว ปริมาณกรดมะนาวและค่าทางจลนพลศาสตร์ที่ได้จากการทดลองนี้จะถูกนำไปเปรียบเทียบกับกรผลิตกรดมะนาวด้วยยีสต์ตรึงและยีสต์อิสระในระบบ perfusion โดยใช้ spinfilter ในขั้นตอนต่อไป



รูปที่ 4.3 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดมะนาว ปริมาณกรดไอโซซิทริก และปริมาณกลูโคสที่เหลือ ที่เวลาต่างๆ เมื่อเลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* NNU-62 ในอาหาร สำหรับผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 5 ลิตร



รูปที่ 4.4 ค่า $Y_{p/s}$ $Y_{x/s}$ และ $Y_{p/x}$ ที่เวลาต่างๆ เมื่อเลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* NNU-62 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 5 ลิตร

4.4 การตรึงเซลล์ *C. oleophila* NNU-62 เพื่อผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 5 ลิตร

ตรึงเซลล์ตามวิธีข้อ 3.5.1 (รูปที่ 4.5) โดยวิธีกักขัง (Entrapment) ในสารละลายแคลเซียมอัลจิเนต เลี้ยงเชื้อตามผลการทดลองข้อ 4.2 เป็นเวลา 9 ชั่วโมง อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุดเท่ากับ 1.367 ชั่วโมง⁻¹ และน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 8.15 กรัมต่อลิตร เซลล์ตรึงที่ได้มีรูปร่างเป็นทรงกลมและมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2 มิลลิเมตร (รูปที่ 4.6) นำเซลล์ตรึงมาผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 5 ลิตร ตามวิธีข้อ 3.5.2 (รูปที่ 4.7)



รูปที่ 4.5 การเตรียมเซลล์ตรึงโดยวิธีกักขังบนแคลเซียมอัลจิเนต



รูปที่ 4.6 ขนาดเซลล์ตรึงที่นำไปใช้ในการผลิตกรดมะนาว



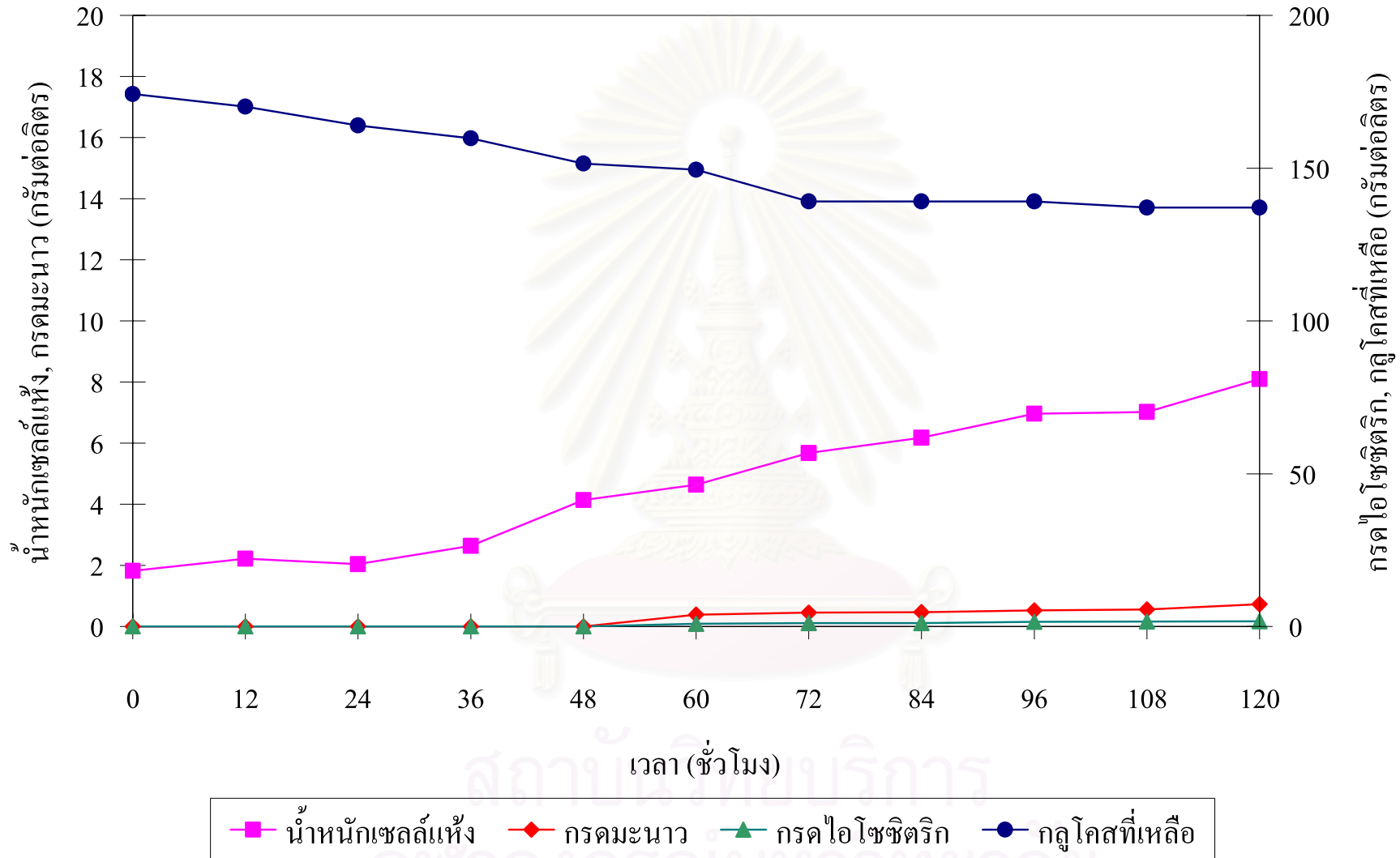
รูปที่ 4.7 การผลิตกรดมะนาวด้วยยีสต์ตรึงในถังหมักขนาด 5 ลิตร

ควบคุมการหมักที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 50 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที ควบคุมค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 5.0 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 40 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เก็บตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมง วิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิเตริก และกลูโคสที่เหลือ ให้ผลดังตารางที่ จ.4 (ภาคผนวก จ) และรูปที่ 4.8 และ 4.9

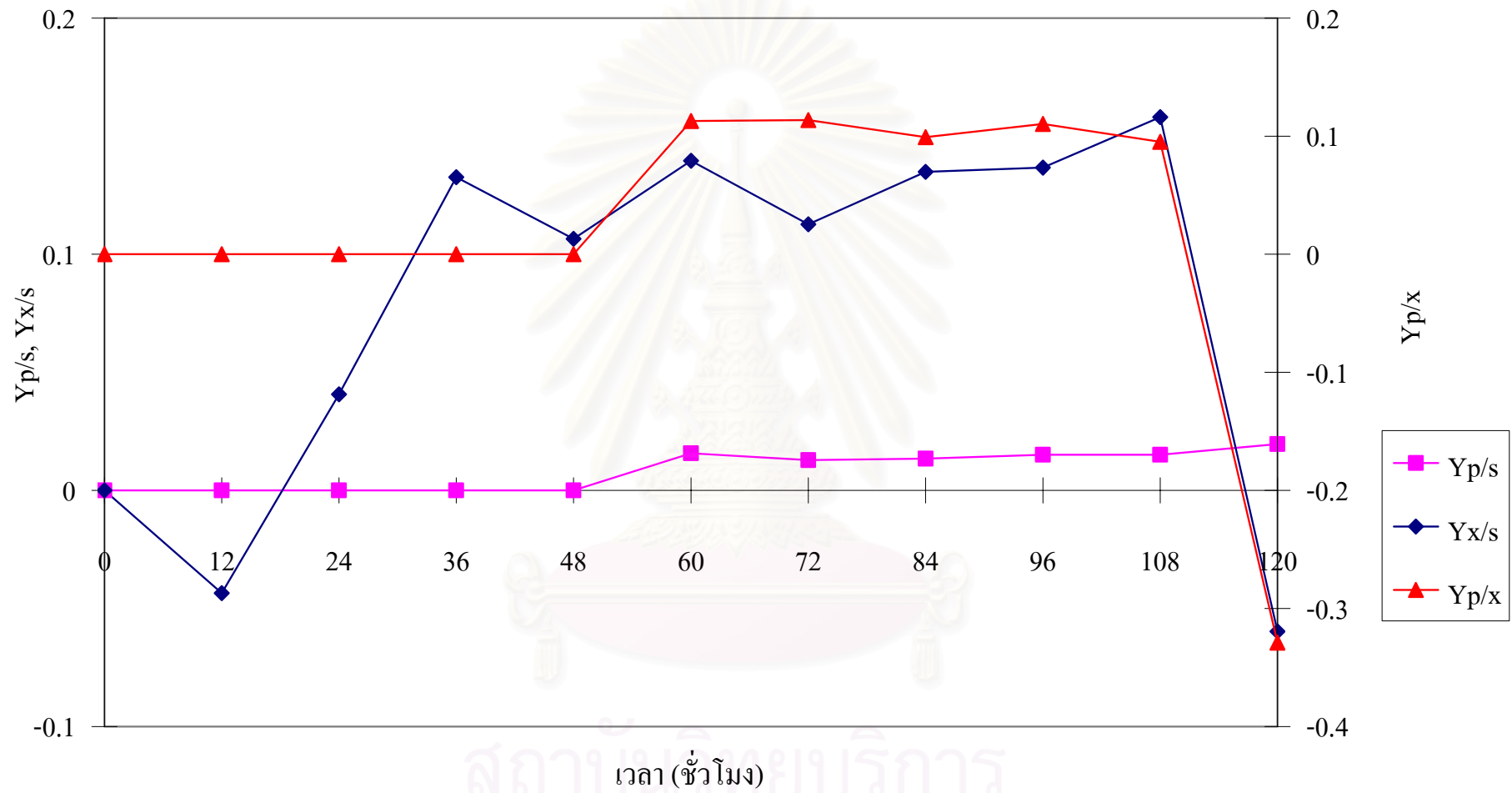
จากรูปที่ 4.8 พบว่าในระหว่างการหมักมีเซลล์ที่ถูกกักในแคลเซียมอัลจินตหลุดออกมาเพราะเมื่อนำน้ำหมักมาวิเคราะห์หาน้ำหนักเซลล์แห้งพบว่ามีค่าเพิ่มขึ้นตามชั่วโมงการหมัก จนถึงสิ้นสุดการหมัก เซลล์ตรึงเริ่มผลิตกรดมะนาวตั้งแต่ชั่วโมงที่ 48 และปริมาณกรดมะนาวเพิ่มขึ้นเล็กน้อยจนถึงสิ้นสุดการหมัก เมื่อสิ้นสุดการหมักได้ความเข้มข้นกรดมะนาวเท่ากับ 0.73 กรัมต่อลิตร ปริมาตรน้ำหมักที่เหลือในถังหมักเท่ากับ 2,650 มิลลิลิตร คิดเป็นปริมาณกรดมะนาวทั้งหมดเท่ากับ 1.93 กรัม และให้อัตราการผลิตกรดมะนาวเท่ากับ 0.006 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง สำหรับปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตด้วยเซลล์ตรึงในการทดลองนี้พบว่ามีปริมาณที่น้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับการผลิตกรดมะนาวด้วยเซลล์อิสระ (168.54 กรัม) ทำให้กลูโคสในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวถูกนำไปใช้เพื่อผลิตกรดมะนาวเพียงเล็กน้อยเช่นกัน

จากรูปที่ 4.9 แสดงค่าการคำนวณทางจลนพลศาสตร์ตั้งแต่เริ่มต้นจนถึงที่เวลาการหมักนั้น เนื่องจากการผลิตกรดมะนาวด้วยยีสต์ตรึง เซลล์จะถูกกักอยู่ในสารตัวกลางและมีเซลล์บริเวณผิวเม็ดตรึงเท่านั้นที่สัมผัสกับอากาศและอาหารเลี้ยงเชื้อจึงทำให้ค่า $Y_{p/s}$ เพิ่มขึ้นเล็กน้อย ค่า $Y_{p/x}$ มีค่าเพิ่มขึ้นตั้งแต่ชั่วโมงที่ 48 ซึ่งเป็นชั่วโมงที่เซลล์เริ่มผลิตกรดมะนาว และเนื่องจากเซลล์ที่นำมาตรึงเจริญอยู่ในระยะช่วงท้ายของการเจริญแบบทวีคูณเซลล์จึงไม่เจริญเพิ่มขึ้นอีกและระหว่างการหมักพบว่ามีเซลล์หลุดออกจากเม็ดตรึงจึงทำให้ค่า $Y_{x/s}$ ไม่คงที่

การตรึงเซลล์เพื่อผลิตกรดมะนาวได้เลือกใช้วิธีกักขังในแคลเซียมอัลจินต เพราะเป็นวิธีที่ทำได้ง่าย ราคาถูก ไม่เป็นพิษต่อเซลล์และเป็นวิธีที่ได้รับความนิยม (Gosmann และ Rehm, 1988) และจากงานวิจัยของภรณ์ (2538) ได้ศึกษาภาวะที่เหมาะสมเพื่อผลิตกรดมะนาวด้วยยีสต์ตรึง *C. oleophila* C-73 พบว่าตัวกลางที่เหมาะสมในการตรึงเซลล์คือแคลเซียมอัลจินตที่มีความเข้มข้นร้อยละ 4 (น้ำหนักต่อปริมาตร) จึงได้นำภาวะดังกล่าวมาใช้ในการตรึงเซลล์ *C. oleophila* NNU-62 เพื่อผลิตกรดมะนาวในการทดลองนี้ ซึ่งเมื่อทำการตรึงแล้วพบว่าขนาดของเม็ดตรึงที่ได้มีขนาดเล็กประมาณ 2-3 มิลลิเมตร ซึ่งจากงานวิจัยของ Horitsu และคณะ (1988) ได้รายงานถึงการแปรขนาดของเม็ดตรึงที่ใช้ในการผลิตกรดมะนาวพบว่าเม็ดตรึงขนาดเล็กสามารถผลิตกรดมะนาวปริมาณสูงกว่าเม็ดตรึงขนาดใหญ่ และจากงานวิจัยของ Kautola และคณะ (1991) ก็พบเช่นเดียวกันว่าเมื่อลดขนาดเม็ดตรึงให้อัตราการผลิตกรดมะนาวเพิ่มขึ้น แต่ในการทดลองนี้พบว่าเมื่อใช้เม็ดตรึงขนาดเล็กมาผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 5 ลิตร ได้กรดมะนาวในปริมาณที่น้อยมากและยังพบว่า



รูปที่ 4.8 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดมะนาว ปริมาณกรดไอโซซิติริก และปริมาณกลูโคสที่เหลือที่เวลาต่างๆ เมื่อเลี้ยงเซลล์ตรึง *C. oleophila* NNU-62 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 5 ลิตร อัตราการกวน 50 รอบต่อนาที



รูปที่ 4.9 ค่า $Y_{p/s}$ $Y_{x/s}$ และ $Y_{p/x}$ ที่เวลาต่างๆ เมื่อเลี้ยงเซลล์ตรึง *C. oleophila* NNU-62 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 5 ลิตร อัตราการกวน 50 รอบต่อนาที

ระหว่างการหมักมีเซลล์หลุดออกมาจากเม็ดตรีง ซึ่งอาจเกิดจากเม็ดตรีงไม่คงตัวเพราะแคลเซียมอัลจินตถูกจับด้วยไอออนต่างๆ ในน้ำหมัก สารอาหาร หรือกรดมะนาวที่ผลิตออกมาระหว่างหมัก (Rymowicz และคณะ, 1993) ทำให้เม็ดตรีงเสียสภาพ นอกจากนี้ได้ควบคุมค่าความเป็นกรดต่างของอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ทำให้แคลเซียมไอออนที่เชื่อมกับอัลจินตถูกแย่งจับด้วยโซเดียมไอออนจากโซเดียมไฮดรอกไซด์ทำให้เม็ดตรีงเสียสภาพได้ และสภาพแวดล้อมในถังหมักอาจเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ทำให้เซลล์หลุดออกจากเม็ดตรีงเช่น การให้อากาศผ่านหัวพ่นอากาศและการกวนผสมด้วยใบพัด เป็นต้น พิจารณาน้ำหนักเซลล์แห้งที่มีค่าเพิ่มขึ้นตามชั่วโมงการหมักซึ่งน้ำหนักเซลล์แห้งที่วัดได้เป็นน้ำหนักของโซเดียมอัลจินตที่แขวนลอยอยู่ร่วมกับเซลล์ยีสต์ที่หลุดออกมาและเติบโตภายนอกเม็ดตรีง (Godia และคณะ, 1987)

เมื่อพิจารณาค่า $Y_{p/s}$ พบว่ามีค่าต่ำมากทำให้กรดมะนาวที่ผลิตได้มีปริมาณน้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ยีสระ ซึ่งสาเหตุอาจเกิดจากสิ่งแวดล้อมทั้งทางกายภาพและเคมี เช่น ข้อจำกัดในการแพร่ผ่านสารเข้าและออกเม็ดเจล อีกทั้งในน้ำหมักซึ่งประกอบด้วยสารหลายชนิดรวมทั้งออกซิเจนที่ละลายน้ำได้อาจถูกขัดขวางการแพร่ผ่านด้วยแผ่นฟิล์มบางๆ ของสารละลายแคลเซียมอัลจินตทำให้เซลล์ภายในเม็ดตรีงไม่สามารถใช้สารอาหารและออกซิเจนที่ละลายน้ำได้เต็มที่ที่มีผลต่อการผลิตกรดมะนาวและลดความสามารถในการผลิตกรดมะนาวของเซลล์ตรีง

(Maddox และ Kingston, 1983)

จากปัญหาดังกล่าวในการทดลองขั้นต่อไปจึงทดลองผลิตกรดมะนาวด้วยยีสต์ตรีงตามวิธีข้อ 3.5.1 และข้อ 3.5.2 และเพื่อลดปัญหาการหลุดของเซลล์จากเซลล์ตรีงอันเนื่องมาจากสิ่งแวดล้อมภายในถังหมักเช่น การกวนผสมด้วยใบพัด จึงไม่ทำการกวนผสมด้วยใบพัดแต่ยังคงให้อากาศผ่านหัวพ่นอากาศ ที่อัตราการให้อากาศสูงสุดเท่ากับ 1.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อเวลาที่ทั้งนี้เนื่องจากยีสต์จะเจริญและผลิตกรดมะนาวในภาวะที่มีออกซิเจนเท่านั้น

4.5 การตรีงเซลล์ *C. oleophila* NNU-62 เพื่อผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยไม่กวนผสม

ทดลองตามวิธีข้อ 3.5.1 และ 3.5.2 ควบคุมการหมักที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส อัตราการให้อากาศ 1.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อเวลาที่ ควบคุมค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 5.0 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 40 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ไม่กวนผสม เก็บตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมง วิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิทริก และกลูโคสที่เหลือ ให้ผลดังตารางที่ 4.5 (ภาคผนวก จ) และรูปที่ 4.10 และ 4.11

จากรูปที่ 4.10 พบว่าน้ำหนักเซลล์แห้งเพิ่มขึ้นตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 จนถึงสิ้นสุดการทดลอง เซลล์ตรีงเริ่มผลิตกรดมะนาวหลังจากชั่วโมงที่ 36 ซึ่งเวลาของการผลิตกรดมะนาวเร็วกว่า

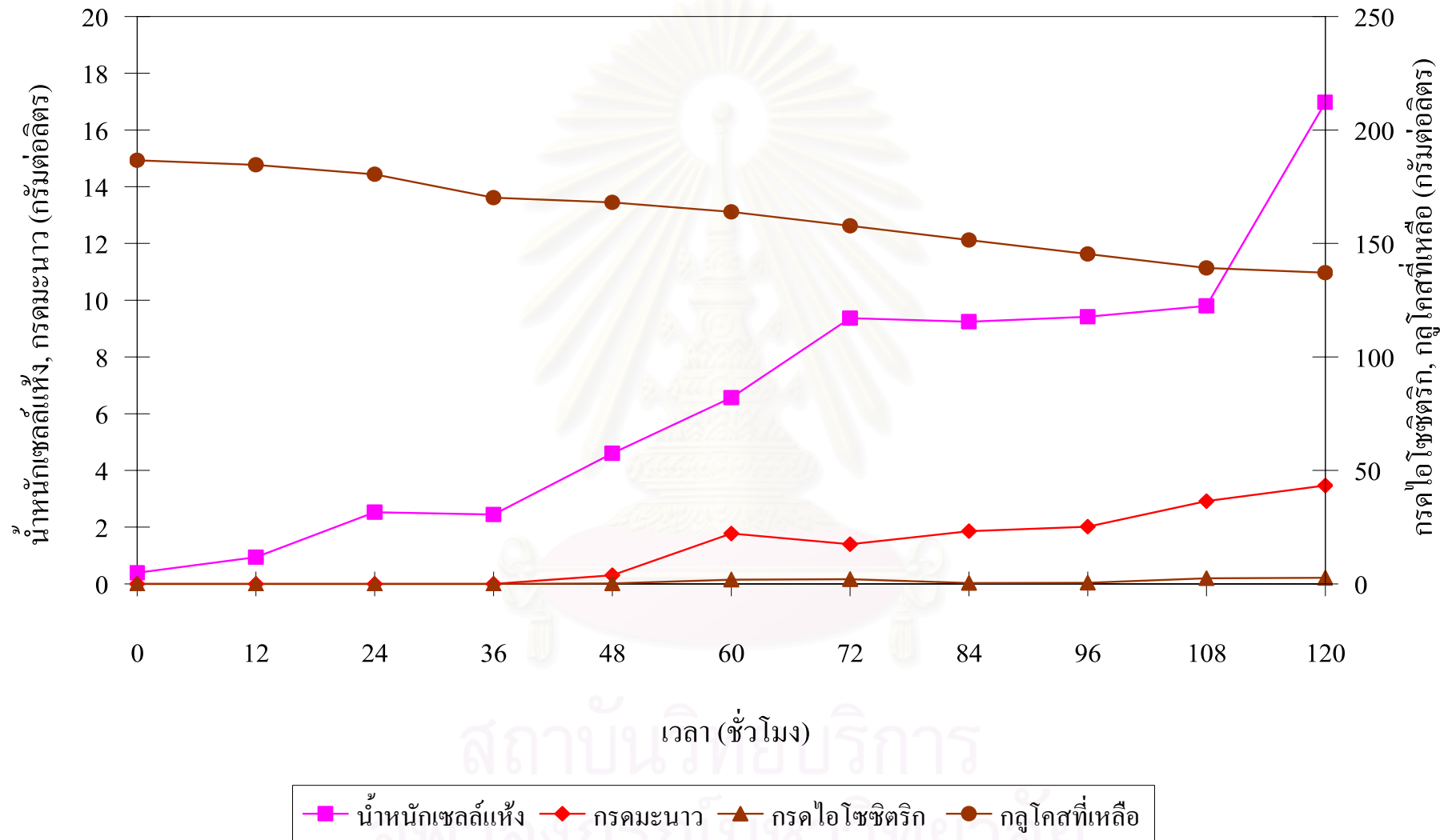
ผลการทดลองที่ 4.4 โดยกรรมะนาวที่ผลิตได้อาจเกิดจากยีสต์อิสระที่หลุดออกจากเม็ดตริงเพราะ น้ำหนักเซลล์แห้งมีค่าเพิ่มขึ้นตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 เมื่อสิ้นสุดการหมักได้ความเข้มข้นกรรมะนาวเท่ากับ 3.47 กรัมต่อลิตร เหลือปริมาตรน้ำหมักประมาณ 2,700 มิลลิลิตร คิดเป็นปริมาณกรรมะนาวทั้งหมด 9.37 กรัม เมื่อสิ้นสุดการหมักให้อัตราการผลิตเท่ากับ 0.029 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ให้ค่าสูงกว่าผลการทดลองข้อ 4.4

จากรูปที่ 4.11 แสดงค่าการคำนวณทางจลนพลศาสตร์ตั้งแต่เริ่มต้นจนถึงที่เวลาการหมักนั้น ค่า Y_p/s เพิ่มขึ้นตั้งแต่ชั่วโมงที่ 36 และสูงกว่าผลการทดลองที่ 4.4 แต่อย่างน้อยก็ต่ำกว่าการผลิตด้วยยีสต์อิสระในผลการทดลองที่ 4.3 เพราะเชื้อที่ถูกตรึงอยู่ในเม็ดเจลไม่สามารถนำกลูโคสมาใช้เพื่อผลิตกรรมะนาวได้เนื่องจากข้อจำกัดของการแพร่ผ่านของสารตั้งที่ได้กล่าวมาแล้ว ค่า Y_p/x มีค่าเพิ่มขึ้นตั้งแต่ชั่วโมงที่ 36 ซึ่งเป็นชั่วโมงที่เซลล์ตรึงเริ่มผลิตกรรมะนาว และมีค่ามากกว่าผลการทดลองข้อ 4.4 จากการทดลองนี้มีน้ำหนักเซลล์แห้งเพิ่มขึ้นตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 กรรมะนาวที่ผลิตได้อาจเกิดจากการผลิตโดยเซลล์อิสระที่หลุดออกจากเม็ดตริงแต่เซลล์ถูกผสมเป็นเนื้อเดียวกันกับสารละลายอัลจินเตออาจทำให้เซลล์ไม่สามารถใช้สารอาหารเพื่อผลิตกรรมะนาวได้เต็มที่ จึงทำให้ค่า Y_p/x ยังมีค่าต่ำกว่าการผลิตด้วยยีสต์อิสระ และเนื่องจากเซลล์ที่นำมาตรึงเจริญอยู่ในระยะช่วงท้ายของการเจริญแบบทวีคูณเซลล์จึงไม่เจริญเพิ่มขึ้นอีกจึงทำให้ค่า Y_x/s ไม่คงที่ โดยมีรูปแบบคล้ายกับผลการทดลองที่ 4.4

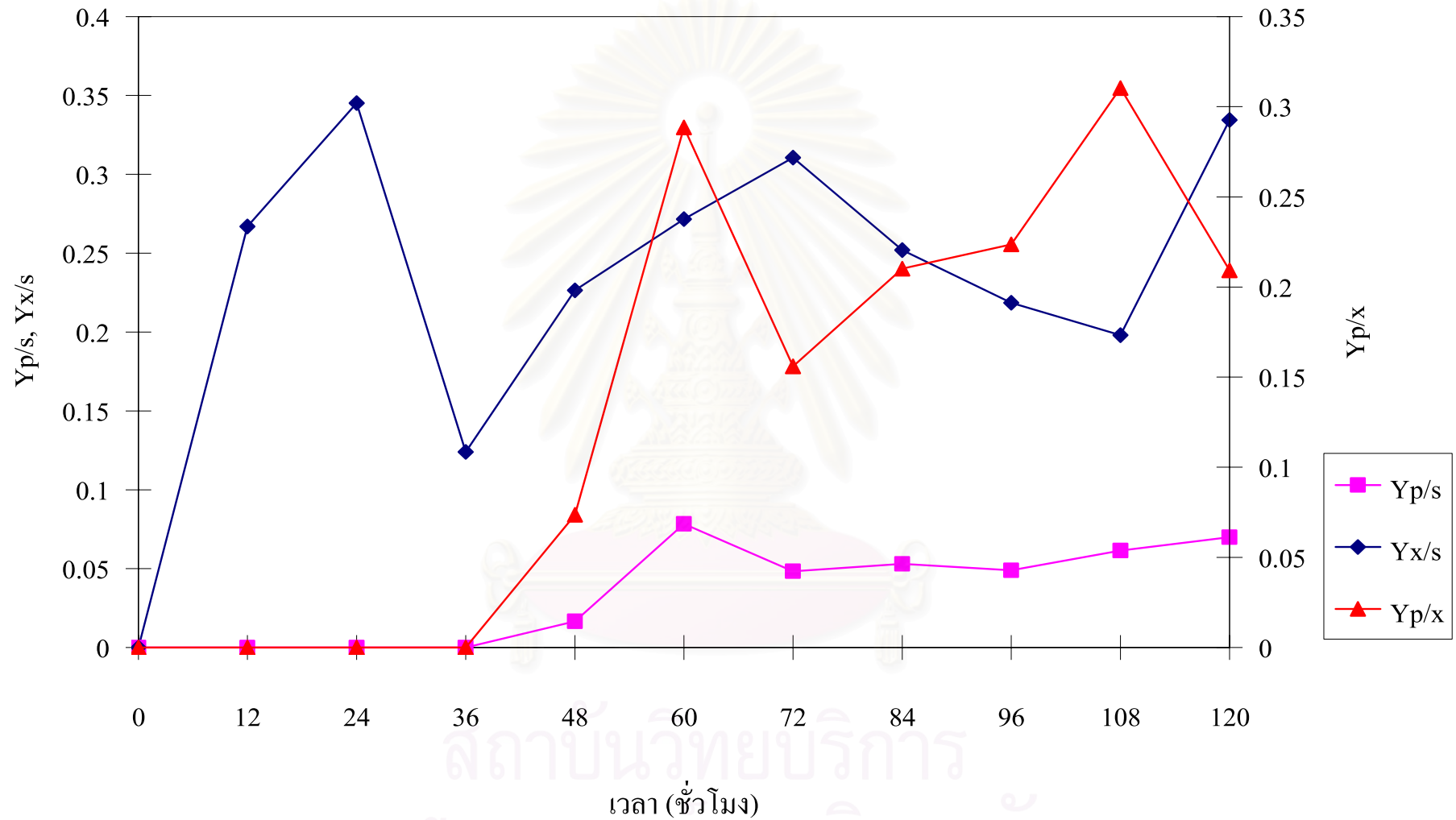
การผลิตกรรมะนาวด้วยยีสต์ตรึงในถังหมักขนาด 5 ลิตรโดยไม่กวนผสม เมื่อสิ้นสุดการทดลองจะได้รับความเข้มข้นกรรมะนาวมากกว่าการเลี้ยงเซลล์ตรึงที่อัตราการกวน 50 รอบต่อนาที ซึ่งมีค่าเท่ากับ 3.47 และ 0.73 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ แต่ความเข้มข้นกรรมะนาวก็ยังมีค่าน้อยกว่าเมื่อผลิตด้วยเซลล์อิสระและยังมีเซลล์หลุดออกจากเม็ดตริง เมื่อพิจารณารูปแบบการผลิตตามผลการทดลองนี้กล่าวได้ว่ามีรูปแบบคล้ายกับการใช้ถังหมักแบบฟลูอิดไดซ์เบด ดังนั้นเพื่อลดปัญหาการหลุดของเซลล์ออกจากเม็ดตริงและพัฒนากระบวนการผลิตเพื่อให้ได้ผลผลิตกรรมะนาวเพิ่มขึ้น ในการทดลองต่อไปจึงทำการผลิตกรรมะนาวด้วยยีสต์ตรึงในถังหมักแบบฟลูอิดไดซ์เบด

4.6 การตรึงเซลล์ *C. oleophila* NNU-62 เพื่อผลิตกรรมะนาวในถังหมักแบบฟลูอิดไดซ์เบด

ตรึงเซลล์ตามวิธีข้อ 3.5.1 และนำเซลล์ตรึงไปผลิตกรรมะนาวในถังหมักแบบฟลูอิดไดซ์เบด ตามวิธีข้อ 3.5.3 ดังแสดงในรูปที่ 4.12 ก่อนทำการหมักต้องฆ่าเชื้อในถังหมักด้วยแอลกอฮอล์ความเข้มข้นร้อยละ 70 แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วจากนั้นจึงเติมอาหารสำหรับผลิตกรรมะนาวปริมาตรเริ่มต้น 2.0 ลิตรแล้วนำเซลล์ตรึงที่เตรียมไว้เติมลงในถังหมัก ควบคุมการหมักที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส กวนผสมโดยการให้อากาศซึ่งอัตราการให้อากาศเท่ากับ 1 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที ควบคุมค่าความเป็นกรดต่างด้วยสารละลาย



รูปที่ 4.10 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดมะนาว ปริมาณกรดไอโซซิทริก และปริมาณกลูโคสที่เหลือที่เวลาต่างๆ เมื่อเลี้ยงเซลล์ตรึง *C. oleophila* NNU-62 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยไม่กวนผสม



รูปที่ 4.11 ค่า $Y_{p/s}$, $Y_{x/s}$ และ $Y_{p/x}$ ที่เวลาต่างๆ เมื่อเลี้ยงเซลล์ตั้ง *C. oleophila* NNU-62 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยไม่กวนผสม

โซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 40 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เก็บตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมง วิเคราะห์น้ำหนักรีดแห้ง ปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซชิตริก และกลูโคสที่เหลือ ให้ผลดังตารางที่ จ.6 (ภาคผนวก จ) และรูปที่ 4.13 และ 4.14

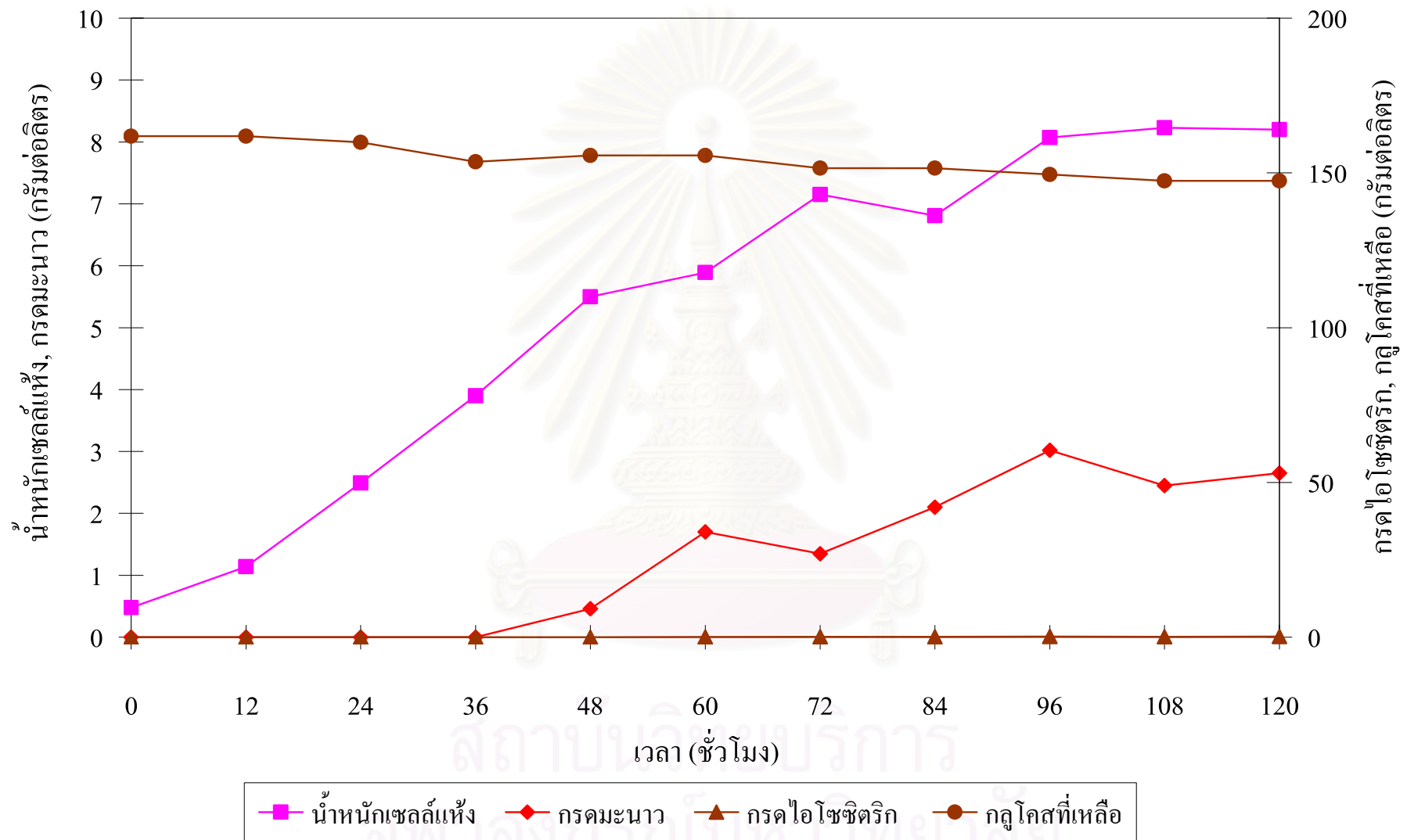


รูปที่ 4.12 การตรึงเซลล์ *C. oleophila* NNU-62 เพื่อผลิตกรดมะนาวในถังหมักแบบฟลูอิดไดซ์เบด

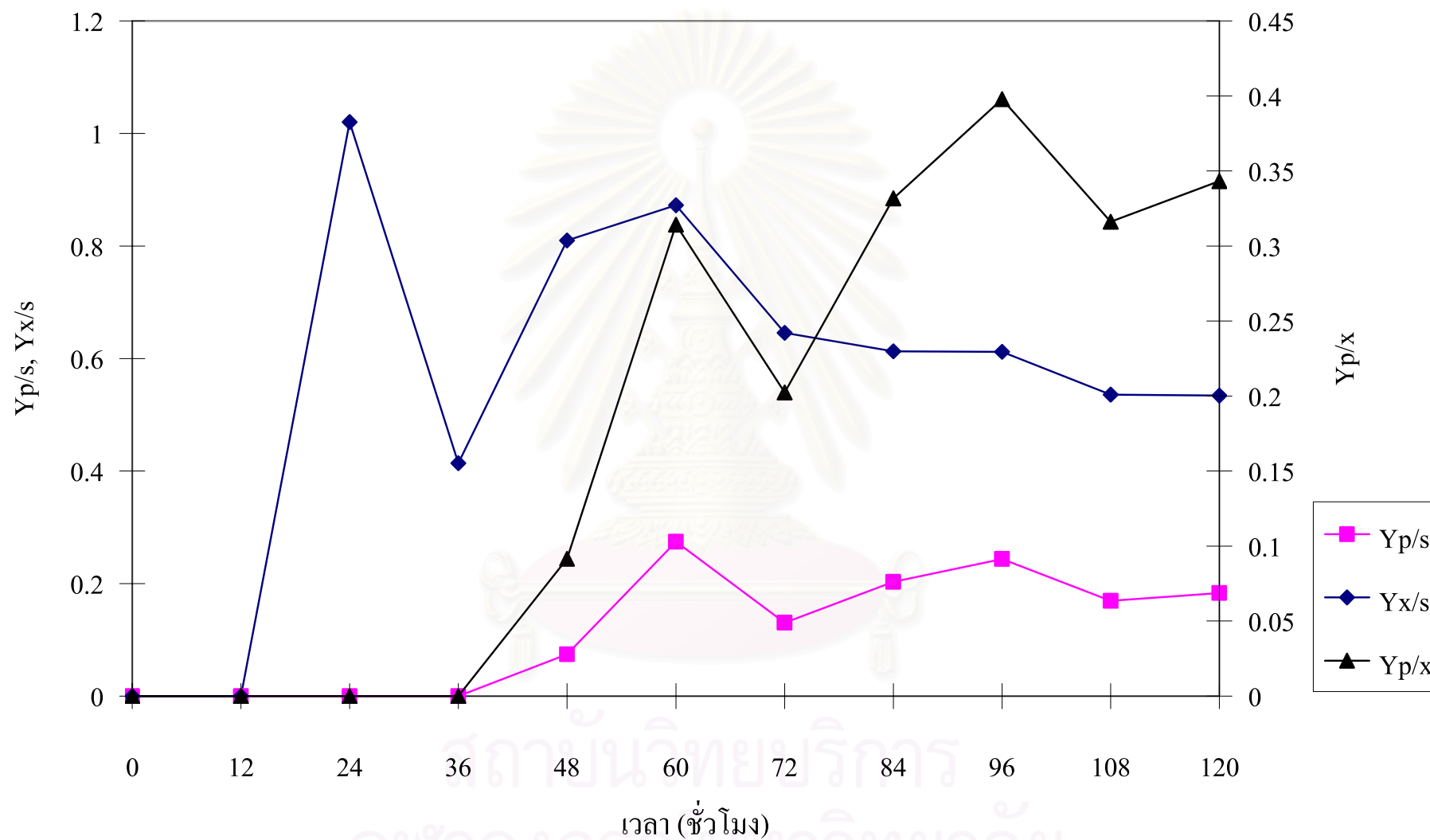
จากการทดลองพบว่าตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 ถึง 120 ในน้ำหมักมีน้ำหนักรีดแห้งเพิ่มขึ้นตามชั่วโมงของการหมัก เซลล์ตรึงเริ่มผลิตกรดมะนาวหลังจากชั่วโมงที่ 36 เป็นต้นไป จนถึงชั่วโมงที่ 120 ได้ความเข้มข้นกรดมะนาวเท่ากับ 2.65 กรัมต่อลิตร หลังสิ้นสุดการหมักเหลือปริมาตรน้ำหมัก 1,100 มิลลิลิตร คิดเป็นปริมาณกรดมะนาวทั้งหมดเท่ากับ 2.92 กรัม ปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตด้วยเซลล์ตรึงในระบบนี้มีปริมาณที่น้อยกว่าผลการทดลองที่ 4.5 (9.37 กรัม) เมื่อสิ้นสุดการหมักให้อัตราการผลิตเท่ากับ 0.022 กรัมต่อลิตรต่อนาที

จากรูปที่ 4.14 แสดงค่าการคำนวณทางจลนพลศาสตร์ตั้งแต่เริ่มต้นจนถึงที่เวลาการหมักนั้น พบว่าค่า $Y_{p/s}$ มีค่าเพิ่มขึ้นตั้งแต่ชั่วโมงที่ 36 และค่า $Y_{p/x}$ มีค่าเพิ่มขึ้นตั้งแต่ชั่วโมงที่ 36 ซึ่งเป็นชั่วโมงที่เซลล์ตรึงเริ่มผลิตกรดมะนาว สำหรับค่า $Y_{x/s}$ มีค่าเพิ่มขึ้นตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 ซึ่งทั้งค่า $Y_{p/s}$ $Y_{p/x}$ และ $Y_{x/s}$ จากผลการทดลองนี้มีค่ามากกว่าการผลิตในถังหมักขนาด 5 ลิตรโดยไม่กวนผสม (ผลการทดลองที่ 4.5)

การเลือกใช้ถังหมักแบบฟลูอิดไดซ์เบดร่วมกับการตรึงเซลล์เป็นอีกวิธีหนึ่งที่ถูกนำมาใช้ในการหมักระดับอุตสาหกรรมเนื่องจากมีข้อดีคือ ในระบบมีเซลล์จำนวนมากทำให้อัตราการผลิตผลิตภัณฑ์เพิ่มขึ้น สะดวกต่อการเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์เมื่อสิ้นสุดการหมัก นอกจากนี้ถังหมักแบบฟลูอิดไดซ์เบดยังช่วยให้อัตราการหมักมีการถ่ายเทมวลสารที่ดีและช่วยลดแรงเฉือนจากการกวนในถังหมักแบบกวน (Santos และคณะ, 2005) แต่จากการทดลองตรึงเซลล์ในสารละลาย



รูปที่ 4.13 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดมะนาว ปริมาณกรดไอโซซिटริก และปริมาณกลูโคสที่เหลือ ที่เวลาต่างๆ เมื่อเลี้ยงเชื้อตรึง *C. oleophila* NNU-62 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวในถังหมักแบบฟลูอิดไคซ์เบด



รูปที่ 4.14 ค่า $Y_{p/s}$ $Y_{x/s}$ และ $Y_{p/x}$ ที่เวลาต่างๆ เมื่อเลี้ยงเซลล์ตั้ง *C. oleophila* NNU-62 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวในถังหมักแบบฟลูอิดไดซ์เบด

แคลเซียมอัลจินเตและนำมาใช้ร่วมกับถังหมักแบบฟลูอิดไดซ์เบด พบว่าเม็ดตรึงไม่คงตัวเพราะยังมีเซลล์อิสระบางส่วนหลุดออกจากเม็ดตรึงซึ่งสาเหตุอาจเกิดจากแคลเซียมอัลจินเตที่ใช้เป็นสารตัวกลางในการตรึงถูกจับด้วยไอออนต่างๆ สารอาหาร และกรดมะนาวที่ถูกผลิตขึ้นในน้ำหมัก (Rymowicz และคณะ, 1993) ดังที่ได้กล่าวมาแล้ว

จากงานวิจัยของ Rymowicz และคณะ (1993) ศึกษาการผลิตกรดมะนาวด้วยยีสต์ตรึงในถังหมักแบบแอร์ลิฟท์ โดยในขั้นตอนการตรึงเซลล์ได้ใช้แคลเซียมอัลจินเตร่วมกับกลูตาอัลดีไฮด์ (glutaraldehyde) เพื่อให้เม็ดเจลมีความแข็งแรงมากขึ้น และพบว่าเมื่อใช้แคลเซียมอัลจินเตที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 2 ถึง 4 เปอร์เซ็นต์ร่วมกับกลูตาอัลดีไฮด์ที่ความเข้มข้นไม่เกิน 0.5 เปอร์เซ็นต์ เม็ดตรึงที่ได้มีความแข็งแรงเพิ่มขึ้นและทำให้ได้ผลผลิตกรดมะนาวเพิ่มขึ้น 25 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นเพื่อเป็นการปรับปรุงวิธีการตรึงเซลล์เพื่อใช้ในการผลิตกรดมะนาวจึงควรเลือกใช้แคลเซียมอัลจินเตร่วมกับกลูตาอัลดีไฮด์เพื่อให้ได้เม็ดตรึงที่คงตัวและลดปัญหาการหลุดของเซลล์ และสามารถนำเซลล์ตรึงมาใช้ซ้ำในการหมักแบบต่อเนื่องได้อีกด้วย เพื่อให้ได้ผลผลิตกรดมะนาวเพิ่มขึ้น ทั้งนี้ต้องคำนึงถึงผลกระทบของกลูตาอัลดีไฮด์ที่มีต่อกิจกรรมของเซลล์ด้วย

เปรียบเทียบการผลิตกรดมะนาวด้วยยีสต์อิสระในถังหมักขนาด 5 ลิตรกับยีสต์ตรึงในถังหมักขนาด 5 ลิตรและถังหมักแบบฟลูอิดไดซ์เบด ดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ค่าทางจลนพลศาสตร์ของการผลิตกรดมะนาวด้วยยีสต์อิสระ *C. oleophila* NNU-62 ในถังหมักขนาด 5 ลิตรกับยีสต์ตรึงในถังหมักขนาด 5 ลิตรและถังหมักแบบฟลูอิดไดซ์เบด

ค่าจากการทดลอง	รูปแบบการหมัก			
	ยีสต์อิสระ ถังหมัก 5 ลิตร	ยีสต์ตรึงในถังหมัก 5 ลิตร		ยีสต์ตรึง ถังหมักฟลูอิดไดซ์เบด
		อัตราการกวน 50 รอบต่อนาที	ไม่กวนผสม	
กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	76.61	0.73	3.47	2.65
เวลาในการหมัก (ชั่วโมง)	120	120	120	120
Y_x/s	0.076	-0.060	0.334	0.534
Y_p/s	0.403	0.020	0.070	0.183
Y_p/x	5.269	-0.329	0.209	0.343
อัตราการผลิต (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)	0.638	0.006	0.029	0.022

จากตารางที่ 4.1 การผลิตกรดมะนาวด้วยยีสต์อิสระในถังหมักขนาด 5 ลิตรสามารถผลิตกรดมะนาวสูงสุดและมีอัตราการผลิตกรดมะนาวเท่ากับ 76.61 กรัมต่อลิตรและ 0.638 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ซึ่งสูงกว่าการผลิตด้วยยีสต์ตรึงทั้งในถังหมักขนาด 5 ลิตรและถังหมักแบบฟลูอิดไดซ์เบด เมื่อพิจารณาถึงขั้นตอนการตรึงเซลล์ยีสต์นั้นใช้ระยะเวลาในการเตรียมเซลล์และตรึงเซลล์ค่อนข้างนาน ซึ่งอาจมีผลต่อการมีชีวิตและกิจกรรมของเซลล์ยีสต์ได้ เมื่อนำเซลล์ตรึงไปทำการผลิตกรดมะนาว จึงทำให้เชื้อไม่สามารถผลิตกรดมะนาวได้เต็มที่และการผลิตกรดมะนาวด้วยเซลล์ตรึงมีข้อจำกัดต่างๆ ในการหมักดังที่ได้กล่าวมาแล้ว ดังนั้นการผลิตกรดมะนาวด้วยยีสต์อิสระจึงมีความเหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการผลิตกรดมะนาวในขั้นตอนต่อไป

การทดลองขั้นต่อไปจะศึกษาการผลิตกรดมะนาวด้วยยีสต์อิสระในถังหมักขนาด 2 ลิตร ในระบบ perfusion โดยใช้ spinfilter รูปแบบการหมักแบบ extractive fermentation

4.7 การผลิตกรดมะนาวด้วยเชื้อ *C. oleophila* NNU-62 ในระดับถังหมักขนาด 2 ลิตร ระบบ perfusion

เนื่องจากการผลิตกรดมะนาวด้วยยีสต์ตรึงในแคลเซียมอัลจินเตทั้งในถังหมักขนาด 5 ลิตรและถังหมักฟลูอิดไดซ์เบด มีข้อจำกัดหลายประการ เช่น ความคงตัวของเม็ดตรึง การถ่ายเทมวลสาร และการควบคุมระบบขณะผลิต เป็นต้น ดังนั้นจึงทดลองผลิตกรดมะนาวด้วยยีสต์อิสระในถังหมักขนาด 2 ลิตรระบบ perfusion โดยใช้ spin filter ซึ่งเป็นอุปกรณ์ที่ช่วยแยกเซลล์และอนุภาคขนาดเล็กออกจากน้ำหมักและทำให้เซลล์ไม่หลุดออกจากระบบ สะดวกต่อการหมักแบบต่อเนื่อง สามารถทำการหมักโดยใช้เซลล์อิสระอีกทั้งช่วยลดระยะเวลาในการเตรียมเซลล์

ทำการทดลองตามวิธีข้อ 3.4.4 ดังแสดงในรูปที่ 4.15 ทำการหมักในถังหมักขนาด 2 ลิตรใช้อุปกรณ์เสริมคือ spin filter ควบคุมการหมักที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที ควบคุมค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 5.0 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 40 อัตราการให้อากาศ 1 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาทีโดยให้อากาศผ่านหัวพ่นอากาศแบบ micro sparger และเปอร์เซ็นต์ออกซิเจนที่ละลายน้ำได้เท่ากับ 50 เปอร์เซ็นต์เก็บตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมง วัดค่าความเป็นกรดต่าง ค่าออกซิเจนที่ละลายน้ำได้ และวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิทริก และกลูโคสที่เหลือ ให้ผลดังตารางที่ 4.7 (ภาคผนวก จ) และรูปที่ 4.16 และ 4.17

จากผลการทดลองพบว่าในช่วงการหมักตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 ถึง 120 เชื้อมีการเจริญเพิ่มขึ้นจนสิ้นสุดการทดลอง พิจารณาเปอร์เซ็นต์ออกซิเจนที่ละลายน้ำได้พบว่าเมื่อเริ่มต้นการหมักปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำได้ยังมีค่าสูงแต่เมื่อเชื้อเริ่มมีการเจริญจะมีการใช้ออกซิเจนเพิ่มมากขึ้นทำให้ปริมาณออกซิเจนจึงลดลง เมื่อน้ำหนักเซลล์แห้งคงที่ ค่าเปอร์เซ็นต์ออกซิเจนที่ละลายน้ำได้

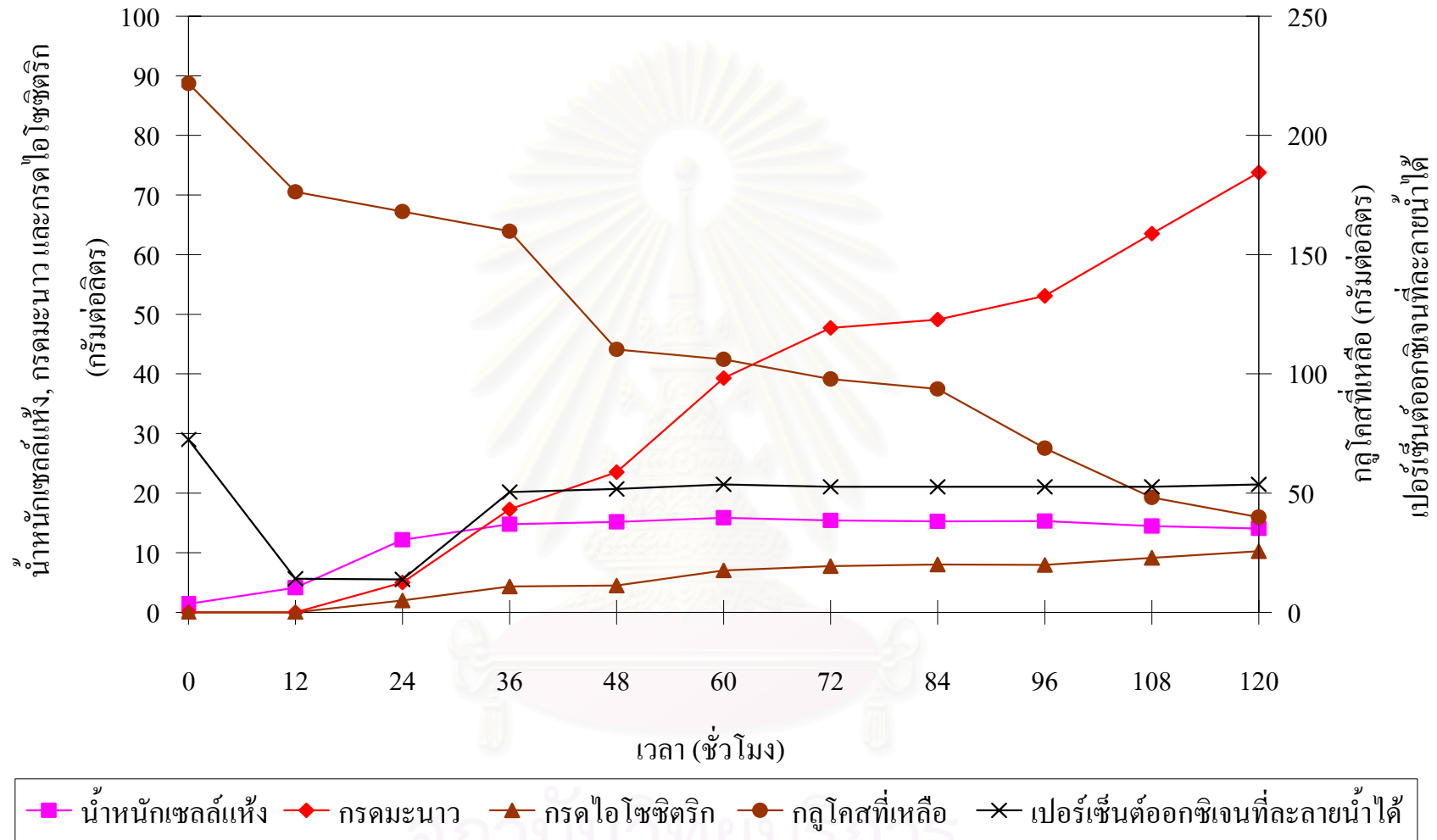


รูปที่ 4.15 การผลิตกรดมะนาวด้วยยีสต์ *C. oleophila* NNU-62 ในถังหมักขนาด 2 ลิตร

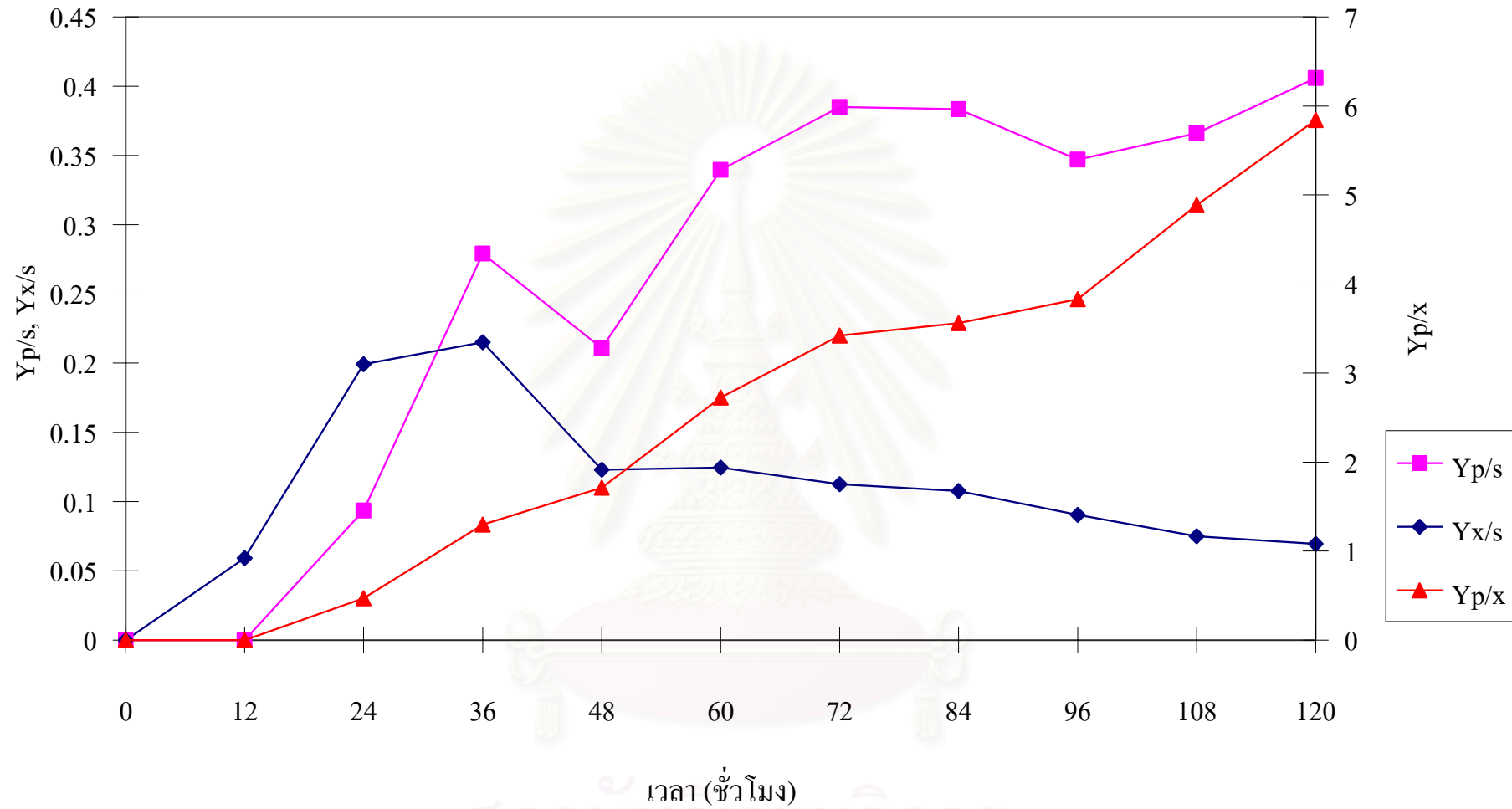
ก็มีค่าคงที่ด้วยเช่นกัน เชื่อจะเริ่มมีการผลิตกรดมะนาวหลังจากชั่วโมงที่ 12 และเมื่อสิ้นสุดการหมัก ได้ความเข้มข้นกรดมะนาวสูงสุดเท่ากับ 73.79 กรัมต่อลิตร เหลือปริมาณน้ำหมัก 1,100 มิลลิลิตร คิดเป็นปริมาณกรดมะนาวทั้งหมดเท่ากับ 81.17 กรัม ให้อัตราการผลิตเท่ากับ 0.615 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

จากรูปที่ 4.17 แสดงค่าการคำนวณทางจลนพลศาสตร์ตั้งแต่เริ่มต้นจนถึงที่เวลาการหมักนั้น พบว่าค่า $Y_{p/s}$ มีค่าเพิ่มขึ้นตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 ค่า $Y_{p/x}$ มีค่าเพิ่มตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 และค่า $Y_{x/s}$ มีค่าเพิ่มขึ้นตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 ทั้งค่า $Y_{p/s}$ $Y_{p/x}$ และ $Y_{x/s}$ มีรูปแบบคล้ายกับการผลิตกรดมะนาวด้วยยีสต์อิสระในถังหมักขนาด 5 ลิตร (ผลการทดลองข้อ 4.3)

การผลิตกรดมะนาวโดยยีสต์เป็นการหมักในภาวะที่ต้องการอากาศ โดยออกซิเจนจะไปทำปฏิกิริยาออกซิเดชันให้กลูโคสเปลี่ยนเป็นกรดมะนาว การผลิตกรดมะนาวจะได้สูงสุดเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีการให้ออกซิเจนอย่างเพียงพอ นอกจากการกวนผสมด้วยใบพัดแล้วการให้อากาศเข้าไปในถังหมักโดยตรงก็เป็นอีกวิธีหนึ่งในการเพิ่มออกซิเจนลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Rane และ Simst, 1994) ในการผลิตกรดมะนาวด้วยเซลล์ยีสต์ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ให้อากาศผ่านหัวพ่นอากาศแบบ ring sparger ซึ่งสามารถครอบคลุมการให้อากาศได้อย่างทั่วถึงทำให้มีการกระจายอากาศที่ดี (สาโรจน์และคณะ, 2544) และกวนผสมด้วยใบพัดแบบเทอร์ไบน์ (disc turbine) ที่อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาทีเมื่อสิ้นสุดการหมักได้ความเข้มข้นกรดมะนาวสูงสุดเท่ากับ 76.61 กรัมต่อลิตร ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับกรหมักในถังหมักขนาด



รูปที่ 4.16 น้ำหนักรเซลล์แห้ง ปริมาณกรดมะนาว ปริมาณกรดไอโซซิติริก ปริมาณกลูโคสที่เหลือและออกซิเจนที่ละลายน้ำได้ที่เวลาต่างๆ เมื่อเลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* NNU-62 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 2 ลิตร



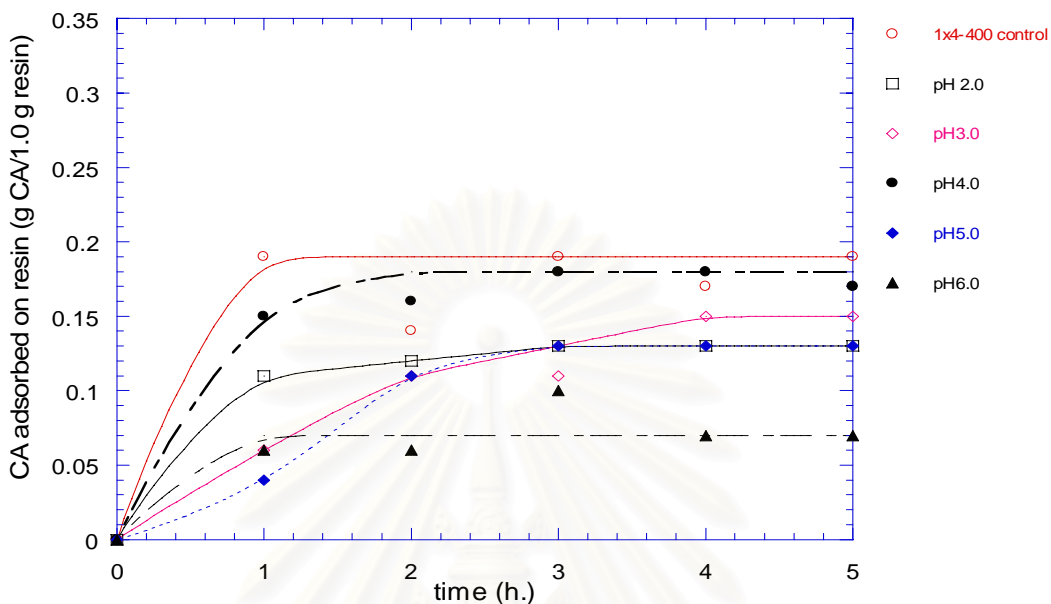
รูปที่ 4.17 ค่า $Y_{p/s}$, $Y_{x/s}$ และ $Y_{p/x}$ ที่เวลาต่างๆ เมื่อเลี้ยงเซลล์ *C. oleophila* NNU-62 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 2 ลิตร

2 ลิตร ที่มีกรรไกรให้อากาศผ่านหัวพ่นอากาศแบบ micro sparger และควบคุมเปอร์เซ็นต์ออกซิเจนที่ละลายน้ำด้วยการกวนและกวนผสมด้วยใบพัดแบบมารีน (marine propeller) ที่อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที เมื่อสิ้นสุดการหมักได้ความเข้มข้นกรดมะนาวสูงสุดเท่ากับ 73.79 กรัมต่อลิตร ซึ่งใกล้เคียงกับการผลิตด้วยยีสต์อิสระในถังหมักขนาด 5 ลิตร และเมื่อพิจารณาค่า $Y_{p/x}$ พบว่าในถังหมักขนาด 5 ลิตรให้ค่าที่ใกล้เคียงกับถังหมักขนาด 2 ลิตรด้วยเช่นกัน (เมื่อสิ้นสุดการหมักมีค่าเท่ากับ 5.269 และ 5.842 ตามลำดับ) ดังนั้นในขั้นตอนต่อไปจึงเลือกใช้ถังหมักขนาด 2 ลิตรในการผลิตกรดมะนาวด้วยยีสต์อิสระ ในระบบ perfusion โดยใช้ spin filter

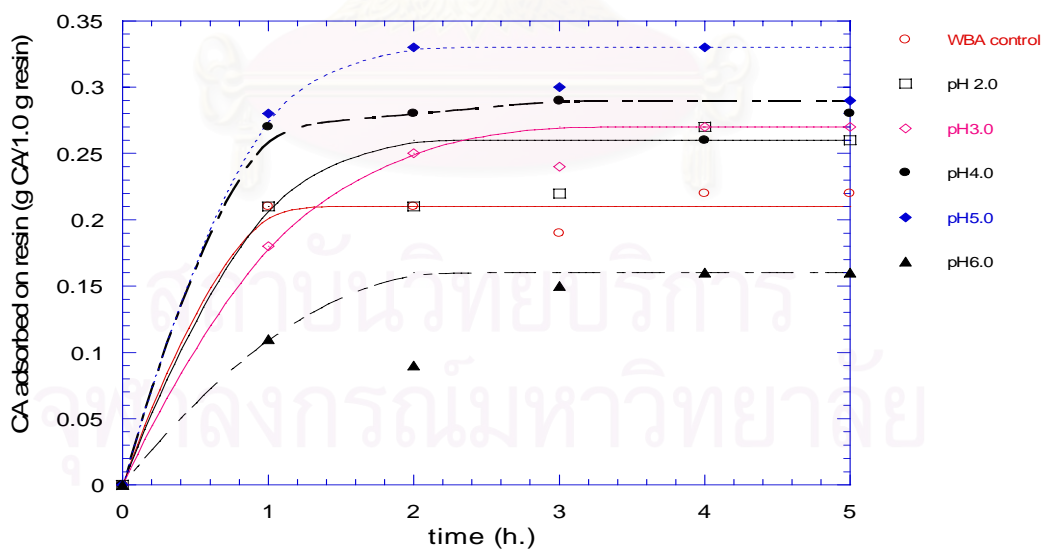
4.8 ศึกษาสมบัติของเรซินแลกเปลี่ยนไอออน

4.8.1 เวลาที่สมดุลของเรซินในการดูดซับกรดมะนาว

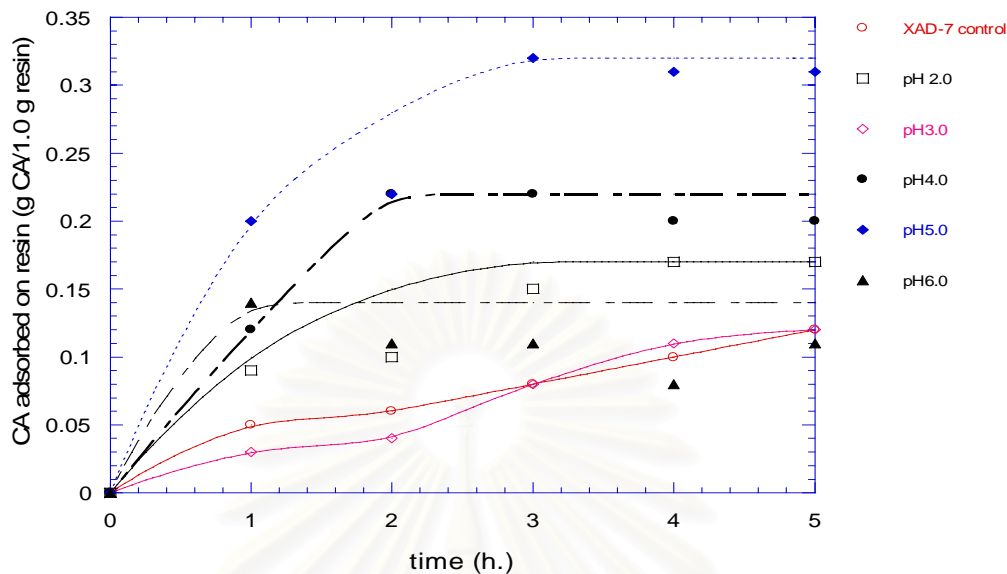
ทดลองตามวิธีข้อ 3.6.1 โดยเลือกศึกษาเรซิน 3 ชนิด คือ เรซินแลกเปลี่ยนไอออนลบชนิดแรง (Dowex 1x4-400) เรซินแลกเปลี่ยนไอออนลบชนิดอ่อน (Dowex Marathon WBA) และ เรซินแบบไม่มีประจุ (Amberlite XAD-7) เปรียบเทียบสมบัติของเรซินทั้ง 3 ชนิด แปรค่าความเป็นกรดต่างของสารละลายกรดมะนาว เพื่อคัดเลือกเรซินที่มีความเหมาะสมในการดูดซับกรดมะนาว เก็บตัวอย่างสารละลายกรดมะนาวทุก ๆ 1 ชั่วโมง เป็นเวลา 5 ชั่วโมง วิเคราะห์ปริมาณกรดมะนาวด้วย HPLC คำนวณหาปริมาณกรดมะนาวที่ถูกดูดซับบนเรซินแต่ละชนิด ให้ผลดังรูปที่ 4.18 ถึง 4.20 พบว่าการดูดซับกรดมะนาวบนเรซินทั้ง 3 ชนิดจะเพิ่มขึ้นในช่วงแรกจากนั้นการดูดซับกรดมะนาวจะเริ่มคงที่จนถึงช่วงท้ายของการทดลองเมื่อเปรียบเทียบช่วงเวลาที่ถึงจุดอิ่มตัวของเรซิน และปริมาณกรดมะนาวที่ถูกดูดซับบนเรซินแต่ละชนิดที่ค่าความเป็นกรดต่าง ๆ พบว่าเรซินทั้ง 3 ชนิด จะเริ่มเข้าสู่สมดุลในช่วง 1 ชั่วโมงแรกของการทดลอง และมีปริมาณการดูดซับกรดมะนาวที่ค่าความเป็นกรดต่าง ๆ ให้ค่าแตกต่างกันไปดังแสดงในตารางที่ จ.8 ถึง จ.10 (ภาคผนวก จ) โดยทั่วไปแล้วเรซินจะเข้าสู่สมดุลของการดูดซับสารละลายภายในเวลา 1 ชั่วโมง (Zihao และ Kefeng, 1995) อธิบายได้ว่าการแลกเปลี่ยนไอออนของเรซินจะมีการดูดซับและปล่อยไอออนออกจากเรซินตลอดเวลาโดยในช่วงต้นของการแลกเปลี่ยนไอออน อัตราการดูดซับมีมากกว่าอัตราการปล่อยไอออนทำให้เห็นการเปลี่ยนแปลงของปริมาณกรดมะนาวได้ชัดเจนจนถึงจุดอิ่มตัวของเรซินซึ่งเป็นจุดที่ไม่สังเกตเห็นการเปลี่ยนแปลงของปริมาณสารเนื่องจากเกิดสมดุลของการแลกเปลี่ยนไอออนซึ่งไอออนที่ถูกดูดซับบนเรซินเท่ากับปริมาณไอออนที่ถูกปล่อยออกจากเรซิน (Hilfferich, 1962)



รูปที่ 4.18 ปริมาณกรดมะนาวที่ถูกดูดซับบนเรซิน Dowex 1x4-400 ที่ค่าความเป็นกรดต่างๆ



รูปที่ 4.19 ปริมาณกรดมะนาวที่ถูกดูดซับบนเรซิน Dowex Marathon WBA ที่ค่าความเป็นกรดต่างๆ



รูปที่ 4.20 ปริมาณกรดมะนาวที่ถูกดูดซับบนเรซิน Amberlite XAD-7 ที่ค่าความเป็นกรดต่าง ๆ

เปรียบเทียบการดูดซับกรดมะนาวสูงสุดในเรซินแต่ละชนิดพบว่าเรซิน Dowex 1x4-400 ดูดซับกรดมะนาวได้สูงสุดเท่ากับ 0.19 กรัมกรดมะนาวต่อกรัมเรซินที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 1.90 เรซิน Dowex Marathon WBA ดูดซับกรดมะนาวได้สูงสุดเท่ากับ 0.33 กรัมกรดมะนาวต่อกรัมเรซินที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 5.00 และเรซิน Amberlite XAD-7 ดูดซับกรดมะนาวได้สูงสุดเท่ากับ 0.32 กรัมกรดมะนาวต่อกรัมเรซินที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 5.00 ดังแสดงในตารางที่ จ.11 (ภาคผนวก จ) และเนื่องจากในขั้นตอนการผลิตกรดมะนาวด้วยยีสต์

C. oleophila NNU-62 ค่าความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการเจริญเท่ากับ 5.00 ดังนั้นในขั้นตอนการดูดซับด้วยเรซินจึงเลือกทำการแยกกรดมะนาวที่ภาวะเดียวกันซึ่งพบว่าที่ภาวะดังกล่าวเรซิน Dowex Marathon WBA และเรซิน Amberlite XAD-7 สามารถดูดซับกรดมะนาวได้สูงสุดเท่ากับ 0.33 และ 0.32 กรัมกรดมะนาวต่อกรัมเรซินตามลำดับ แต่ในการดูดซับกรดมะนาวของเรซิน Amberlite XAD-7 มีความแตกต่างในการดูดซับกรดมะนาวที่ค่าความเป็นกรดต่างอื่นๆ ค่อนข้างมากอาจเนื่องมาจากคุณสมบัติในการแลกเปลี่ยนไอออนของเรซิน Amberlite XAD-7 ซึ่งเป็นเรซินแบบไม่มีประจุเหมาะสมที่จะใช้แยกสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงๆ ตั้งแต่ 60,000 เป็นต้นไป เช่น อินซูลิน (insulin), แอนติไบโอติก (antibiotics) เป็นต้น สำหรับเรซินแลกเปลี่ยนไอออนลบชนิดอ่อนมีคุณสมบัติเหมาะสมในการแยกกรดอินทรีย์และได้มีการนำเรซินชนิดดังกล่าวไปใช้ในการแยกและทำให้บริสุทธิ์ของกรดแลคติก (Tong และคณะ, 2003) ดังนั้นในขั้นตอนต่อไปจึง

เลือกใช้เรซิน Dowex Marathon WBA ในการแยกกรดมะนาวเพราะดูดซับกรดมะนาวได้มากที่สุด
ที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 5.00

4.8.2 เวลาที่สมดุลของเรซิน Dowex Marathon WBA ในการดูดซับกรดมะนาว

ทดลองตามวิธีข้อ 3.6.1 เทสารละลายกรดมะนาวลงในขวดบรรจุเรซินที่
ความเข้มข้นเริ่มต้น 84.83 กรัมต่อลิตรปริมาตร 25 มิลลิลิตรปรับค่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้นเท่ากับ
5.00 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ ปริมาณกรดมะนาวเริ่มต้นเท่ากับ 2.11 กรัม เขย่าที่ความเร็วรอบ 300
รอบต่อนาที เริ่มจับเวลาที่เก็บตัวอย่างทุกๆ 10 นาที เป็นเวลา 60 นาที วิเคราะห์หาปริมาณกรด
มะนาวด้วย HPLC เวลาที่สมดุลของเรซินจะถูกนำไปใช้เป็นข้อมูลในการหาอัตราการไหลเบื้องต้น
สำหรับการดูดซับกรดมะนาวของคอลัมน์แลกเปลี่ยนไอออนต่อไป

จากการทดลองให้ผลดังตารางที่ จ.12 (ภาคผนวก จ) และรูปที่ 4.21 พบว่ามีการ
ลดลงของปริมาณกรดมะนาวอย่างรวดเร็วในช่วง 10 นาทีแรก จากนั้นจะพบการลดลงของปริมาณ
กรดมะนาวอย่างช้าๆ จนไม่สังเกตเห็นความเปลี่ยนแปลงในช่วงท้ายของการทดลอง อธิบายได้ว่า
ในการแลกเปลี่ยนไอออนของเรซินจะมีการดูดซับและปล่อยไอออนทำให้เห็นการเปลี่ยนแปลงของ
ปริมาณกรดมะนาวอย่างชัดเจนถึงจุดอิ่มตัวของเรซินซึ่งเป็นจุดที่ไม่สังเกตเห็นการเปลี่ยนแปลงของ
ปริมาณสารเนื่องจากเกิดสมดุลของการแลกเปลี่ยนไอออนซึ่งไอออนที่ถูกดูดซับบนเรซินเท่ากับ
ปริมาณไอออนที่ถูกปล่อยออกจากเรซิน (Hilfferich, 1962)

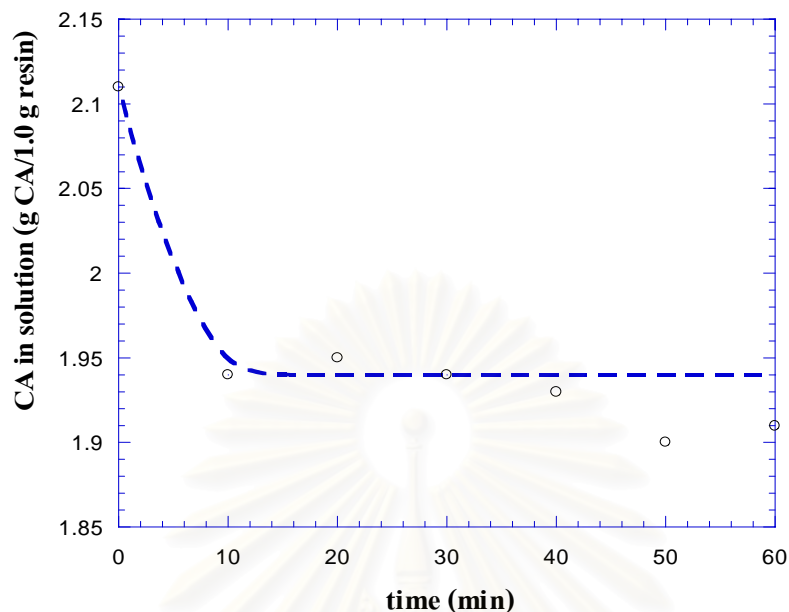
หาเวลาที่สมดุลของเรซินในการดูดซับกรดมะนาว โดยวาดกราฟระหว่างปริมาณ
กรดมะนาวที่ไม่ถูกดูดซับกับเวลาในการดูดซับแสดงดังรูปที่ 4.21 ลากเส้นสัมผัสลากเส้นสัมผัสโค้ง
ตามแนวตั้งและแนวนอนของเส้นกราฟ จุดตัดของเส้นตรง 2 เส้น คือเวลาที่สมดุลของเรซินในการ
ดูดซับกรดมะนาว ซึ่งมีค่าเท่ากับ 8 นาที

จากเวลาที่ถึงจุดอิ่มตัวของเรซินในการดูดซับกรดมะนาวนี้ นำมาคำนวณหาอัตรา
การไหลสูงสุดของสารละลายที่ผ่านเข้าคอลัมน์ โดยอาศัยหลักการที่ว่า ระยะเวลาที่สารละลายกรด
มะนาวสัมผัสกับเรซิน (contact time) ต้องมากกว่าหรือเท่ากับระยะเวลาที่ถึงจุดอิ่มตัวของเรซิน
เพื่อให้เกิดการแลกเปลี่ยนไอออนได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงสุด คำนวณหาอัตราการไหลจากสมการ

$$\text{อัตราการไหล} = \frac{\text{ปริมาตรว่างระหว่างเรซิน}}{\text{ระยะเวลาที่กรดมะนาวสัมผัสกับเรซิน}}$$

(มิลลิลิตร/นาที)

ปริมาตรว่างระหว่างเรซินของคอลัมน์ที่ทดลองเท่ากับ 4.0 มิลลิลิตร และเวลาที่
ต่ำสุดที่สารละลายกรดมะนาวสัมผัสกับเรซิน คือ 8.0 นาที



รูปที่ 4.21 ปริมาณกรดมะนาวที่ไม่ถูกดูดซับบนเรซิน Dowex Marathon WBA ที่เวลาในการดูดซับต่างๆ

$$\begin{aligned} \text{อัตราการไหลสูงสุดของสารละลาย} &= 4.0 / 8.0 && \text{มิลลิลิตร/นาที} \\ &= 0.5 && \text{มิลลิลิตร/นาที} \end{aligned}$$

คิดอัตราการไหลในหน่วย space velocity ได้เท่ากับ 7.5 มิลลิลิตรต่อชั่วโมงต่อมิลลิลิตรของปริมาตรว่างระหว่างเรซิน

ดังนั้น ในการทดลองดูดซับกรดมะนาวของคอลัมน์แลกเปลี่ยนไอออน ควรต้องควบคุมอัตราการไหลของสารละลายให้ต่ำกว่าหรือเท่ากับ 7.5 มิลลิลิตรต่อชั่วโมงต่อมิลลิลิตรของปริมาตรว่างระหว่างเรซิน

4.8.3 ศึกษา ion exchange isotherm

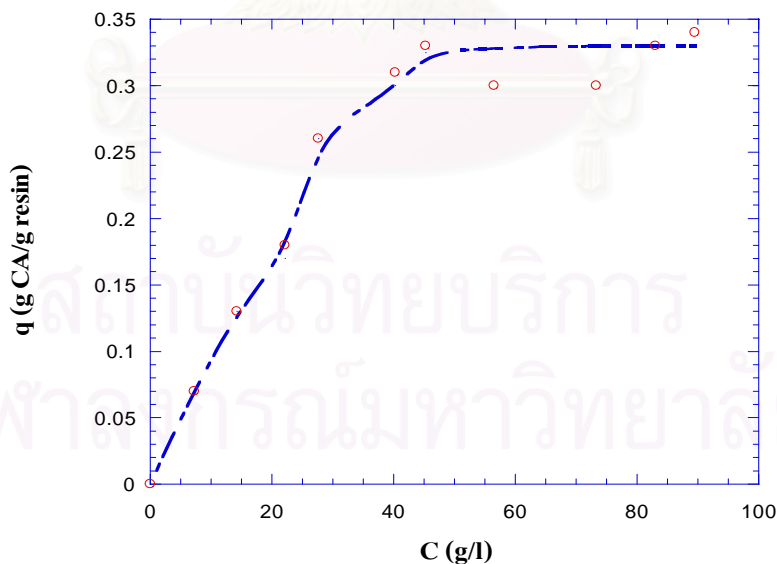
นำเรซิน Dowex Marathon WBA มาศึกษา ion exchange isotherm ซึ่งแสดงถึงความสามารถในการดูดซับกรดมะนาวของเรซิน และนำข้อมูลไปคำนวณหาปริมาณเรซินที่เหมาะสมในการแยกกรดมะนาวด้วยคอลัมน์แลกเปลี่ยนไอออนในขั้นตอนต่อไป ทดลองตามวิธีข้อ 3.6.2 โดยถ้ำเรซินปริมาณ 1.0 กรัม ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร เติมสารละลายกรดมะนาวแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 25 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12

ชั่วโมง เก็บตัวอย่างสารละลายกรดมะนาว วิเคราะห์หาปริมาณกรดมะนาวด้วย HPLC คำนวณความเข้มข้นกรดมะนาวที่สมดุลและปริมาณกรดมะนาวที่ถูกดูดซับต่อกรัมเรซิน แปรลักษณะสารละลายได้แก่ สารละลายกรดมะนาวเกรดทางการค้าและกรดมะนาวที่มีในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาว ที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 5.00 วาดกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกรดมะนาวที่สมดุล, c (กรัมต่อลิตร) และ ปริมาณกรดมะนาวที่ถูกดูดซับ, q_0 (กรัมกรดมะนาวต่อกรัมเรซิน) เพื่อทราบรูปแบบของการดูดซับของเรซินและคำนวณหาค่าความสามารถในการดูดซับสูงสุด (maximum adsorption capacity, q_0) และ ค่าคงที่ของการดูดซับ (adsorption constant, K)

จากผลการทดลอง Ion exchange isotherm ของเรซิน Dowex Marathon WBA ในการดูดซับกรดมะนาวในสารละลายกรดมะนาวเกรดทางการค้าที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 5.00 ให้ผลแสดงดังตารางที่ จ.13 (ภาคผนวก จ) และรูปที่ 4.22 พบว่า ion exchange isotherm ที่ได้มีลักษณะแบบ Langmuir isotherm ซึ่งมีรูปแบบความสัมพันธ์ของตัวแปรต่างๆ ดังนี้

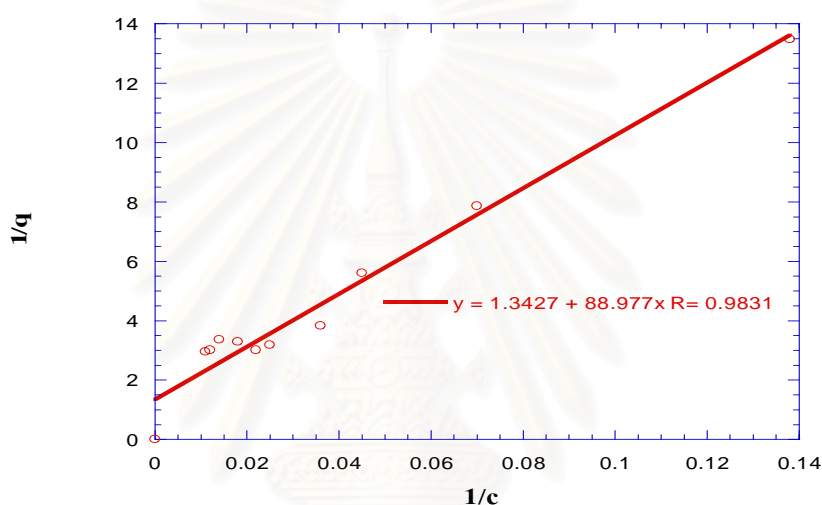
$$q = \frac{q_0 c}{K + c}$$

โดยที่ q_0 คือ ค่าความสามารถในการดูดซับสูงสุด หน่วย กรัมสารที่ถูกดูดซับต่อกรัมเรซิน
 K คือ ค่าสัมประสิทธิ์การเลือก หน่วย กรัมต่อลิตร



รูปที่ 4.22 Ion exchange isotherm ของเรซิน Dowex Marathon WBA ในการดูดซับกรดมะนาวในสารละลายกรดมะนาวเกรดทางการค้าที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 5.00

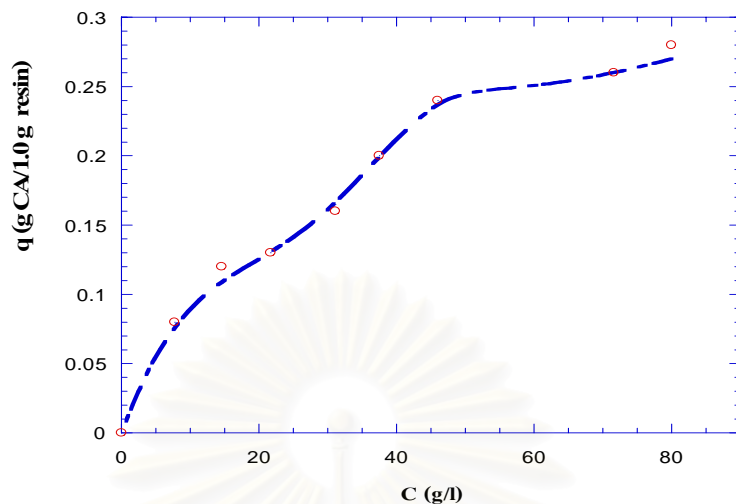
จากรูปแบบของ isotherm ที่ได้สามารถใช้อธิบายการดูดซับสารแบบ monolayer และเรซินอยู่ในภาวะอิ่มตัวกับสารละลายที่ถูกดูดซับ และเพื่อหาค่าตัวแปรต่างๆ ทำการวาดกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า $1/c$ และ $1/q$ เพื่อหาค่าตัวแปร q_0 และค่า K ซึ่งมีความสัมพันธ์ดังนี้คือ $\text{slope} = K/q_0$ และ $\text{intercept} = 1/q_0$ ดังแสดงในรูปที่ 4.23 จะได้ว่า q_0 มีค่าเท่ากับ 0.74 กรัมกรดมะนาวต่อกรัมเรซิน และ K มีค่าเท่ากับ 65.84 กรัมต่อลิตร จากค่าตัวแปรดังกล่าวจะพบว่าเรซิน Dowex Marathon WBA สามารถดูดซับกรดมะนาวในสารละลายกรดมะนาวเกรดทางการค้าที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 5.00 มากที่สุดประมาณ 0.74 กรัมกรดมะนาวต่อกรัมเรซิน



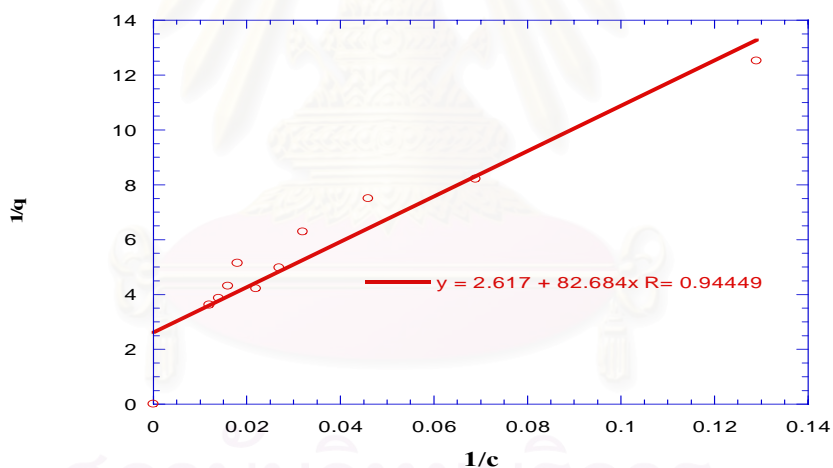
รูปที่ 4.23 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า $1/c$ และ $1/q$ ของเรซิน Dowex Marathon WBA ในการดูดซับสารละลายกรดมะนาวเกรดทางการค้าที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 5.00

สำหรับ isotherm ของเรซิน Dowex Marathon WBA ในการดูดซับกรดมะนาวในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาว ที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 5.00 ให้ผลแสดงดังตารางที่ จ.14 (ภาคผนวก จ) และรูปที่ 4.24 พบว่าที่ได้มีลักษณะแบบ Langmuir isotherm เช่นเดียวกับ isotherm ของการดูดซับกรดมะนาวเกรดทางการค้าที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 5.00 วาดกราฟระหว่างค่า $1/c$ และ $1/q$ เพื่อหาค่าตัวแปร q_0 และค่า K ซึ่งมีความสัมพันธ์ดังนี้คือ $\text{slope} = K/q_0$ และ $\text{intercept} = 1/q_0$ ดังแสดงในรูปที่ 4.25

จากรูปที่ 4.25 จะได้ว่า q_0 มีค่าเท่ากับ 0.38 กรัมกรดมะนาวต่อกรัมเรซิน และ K มีค่าเท่ากับ 31.42 กรัมต่อลิตร จากค่าตัวแปรดังกล่าวจะพบว่า เรซิน Dowex Marathon WBA จะดูดซับกรดมะนาวในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาว ได้ปริมาณมากที่สุดที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 5.00 ได้ประมาณ 0.38 กรัมกรดมะนาวต่อกรัมเรซิน เมื่อเปรียบเทียบกับค่าดังกล่าวกับการดูดซับกรดมะนาวในสารละลายกรดมะนาวเกรดการค้า (0.74 กรัมกรดมะนาวต่อกรัมเรซิน) พบว่าการ



รูปที่ 4.24 Ion exchange isotherm ของเรซิน Dowex Marathon WBA ในการดูดซับกรดมะนาวในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 5.00



รูปที่ 4.25 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า $1/c$ และ $1/q$ ของเรซิน Dowex Marathon WBA ที่ดูดซับกรดมะนาวในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 5.00

ดูดซับที่ได้น้อยกว่าซึ่งอาจเกิดจากในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวที่ประกอบด้วยไอออนลบอื่นๆ ที่เป็นสารอาหารที่จำเป็นในการเจริญของเชื้อยีสต์ เช่น ฟอสเฟตไอออน (PO_4^{3-}), คลอไรด์ไอออน (Cl^-) และซัลเฟตไอออน (SO_4^{2-}) เป็นต้น ซึ่งมีผลในการแย่งจับกับเรซินของซีเตรทไอออน จึงทำให้ค่าการดูดซับน้อยกว่าในสารละลายกรดมะนาวเกรดทางการค้าที่ไม่มีไอออนลบอื่นเจือปน จากงานวิจัยของ Jianlong และคณะ (2000) ศึกษาการผลิตกรดมะนาวด้วยเชื้อรา *A. niger* ควบคู่กับการ

แยกผลิตภัณฑ์ด้วยการดูดซับด้วยเรซินแลกเปลี่ยนไอออน และได้ศึกษาเปรียบเทียบผลของเรซินที่มีต่อองค์ประกอบต่างๆ ในน้ำหมัก เช่น ว น้ำตาลรีดิวิซ์ แอมโมเนียมคลอไรด์ และโปแตสเซียม ไดไฮโดรเจนฟอสเฟต พบว่าหลังทำการแยกด้วยเรซินแลกเปลี่ยนไอออน ปริมาณของน้ำตาลรีดิวิซ์ และแอมโมเนียมคลอไรด์ไม่เปลี่ยนแปลง แต่ความเข้มข้นของโปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตมีค่าลดลงจนมีค่าเท่ากับ 0.00 กรัมต่อลิตร ซึ่งทำให้สารอาหารที่จำเป็นในการเจริญของเซลล์ถูกดึงออกจากน้ำหมัก มีผลต่อการเจริญของเชื้อราและฟอสเฟตไอออนจะแย่งจับกับซิเตรทไอออนทำให้ประสิทธิภาพการแยกของเรซินลดลงด้วย

4.9 ภาวะที่เหมาะสมสำหรับการดูดซับกรดอะมิโนของคอลัมน์แลกเปลี่ยนไอออน

4.9.1 ขั้นตอนการดูดซับ

หาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการดูดซับกรดอะมิโนของคอลัมน์แลกเปลี่ยนไอออน ทดลองโดยใช้คอลัมน์แก้วขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.8 เซนติเมตร ความยาว 40 เซนติเมตร บรรจุเรซินแลกเปลี่ยนไอออนลบ Dowex Marathon WBA ปริมาณ 15 กรัม มีปริมาตรว่างระหว่างเรซิน (void volume) 4.0 มิลลิลิตร โดยแปรปัจจัยคือ ลักษณะของสารละลายกรดอะมิโนที่ผ่านเข้าคอลัมน์ และอัตราการไหลของสารละลาย ได้ผลการทดลองดังนี้

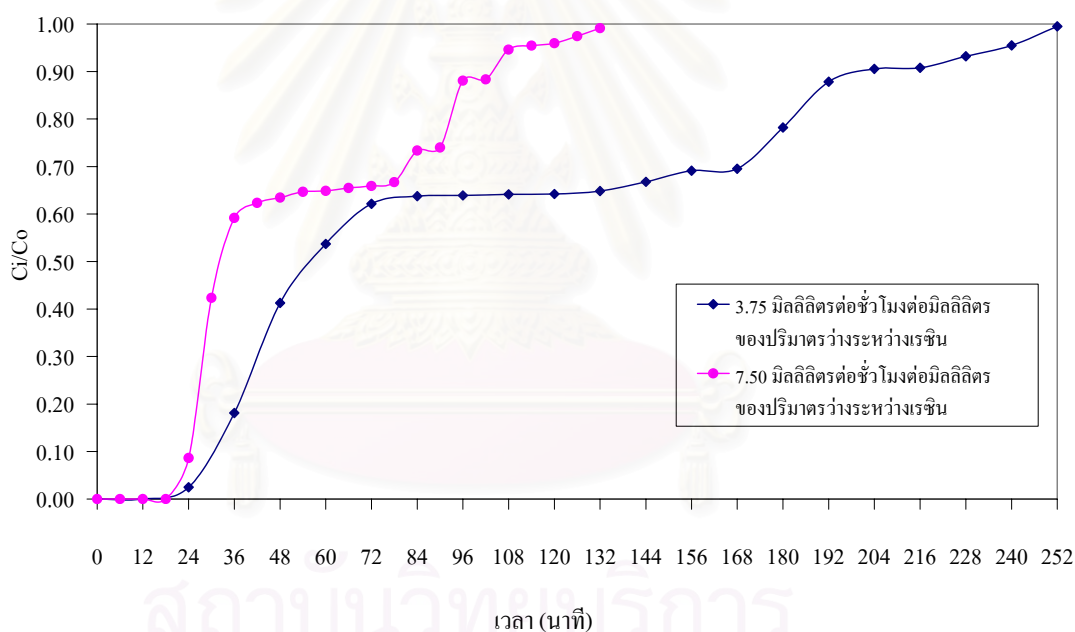
4.9.1.1 Breakthrough curve

ทดลองผ่านสารละลายกรดอะมิโนเข้าคอลัมน์ เตรียมสารละลายกรดอะมิโนตามวิธีทดลองข้อ 3.7.3.1.2 สารละลายกรดอะมิโนที่นำมาทดลองในขั้นตอนนี้ได้แก่ สารละลายกรดอะมิโนเกรดทางการค้าความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตรที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 5.00 และน้ำหมักของกรดอะมิโนที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 5.30 ควบคุมอัตราการไหลของสารละลายให้คงที่เท่ากับ 3.75 และ 7.50 มิลลิลิตรต่อชั่วโมงต่อมิลลิลิตรของปริมาตรว่างระหว่างเรซิน ซึ่งอัตราการไหลต้องต่ำกว่าหรือเท่ากับอัตราการไหลสูงสุดที่คำนวณได้จากผลการทดลองข้อ 4.8.2 ทดลองที่อุณหภูมิห้อง เก็บสารละลายที่ไหลออกจากคอลัมน์เป็นลำดับส่วน วิเคราะห์หาความเข้มข้นของกรดอะมิโนในแต่ละลำดับส่วน คำนวณหาอัตราส่วนของความเข้มข้นกรดอะมิโนในแต่ละลำดับส่วนต่อความเข้มข้นเริ่มต้น (C_t/C_0) ปริมาณสะสมของกรดอะมิโนที่ผ่านเข้าคอลัมน์ ปริมาณกรดอะมิโนที่ถูกดูดซับ และเปอร์เซ็นต์การดูดซับ

Breakthrough curve แสดงถึงประสิทธิภาพในการดูดซับกรดอะมิโนของคอลัมน์ โดยพิจารณาจากปริมาณกรดอะมิโนที่คอลัมน์ดูดซับได้ก่อนถึงจุดที่พบการรั่วของกรดอะมิโนออก

จากคอลัมน์ (breakthrough point) ซึ่งคือจุดแรกที่กราฟเริ่มมีความชัน ถ้ากรรมนะนาที่คอลัมน์ดูดซับได้ก่อนถึงจุดที่พบการรั่วมีปริมาณมาก การดูดซับกรรมนะนาของคอลัมน์จะมีประสิทธิภาพสูง เนื่องจาก breakthrough curve ในการทดลองนี้ทำการวาดกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า C_t/C_0 กับเวลา จึงอธิบายลักษณะของ breakthrough curve โดยเลือกเวลา 2 ค่า ได้แก่ breakthrough time, t_B คือเวลาที่สารละลายกรรมนะนาเริ่มรั่วออกจากคอลัมน์และ exhaustion time, t_E คือเวลาที่คอลัมน์หมดประสิทธิภาพในการดูดซับ (Zihao และ Kefeng, 1995)

Breakthrough curve ของการดูดซับกรรมนะนาในสารละลายกรรมนะนากรดทางการค้าที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 5.00 ด้วยคอลัมน์แลกเปลี่ยนไอออนที่อัตราการไหลเท่ากับ 3.75 และ 7.50 มิลลิลิตรต่อชั่วโมงต่อมิลลิลิตรของปริมาตรว่างระหว่างเรซิน ให้ผลดังตารางที่ จ.15 และ จ.16 (ภาคผนวก จ) ตามลำดับ โดยวาดกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า C_t/C_0 กับเวลา ดังแสดงในรูปที่ 4.26

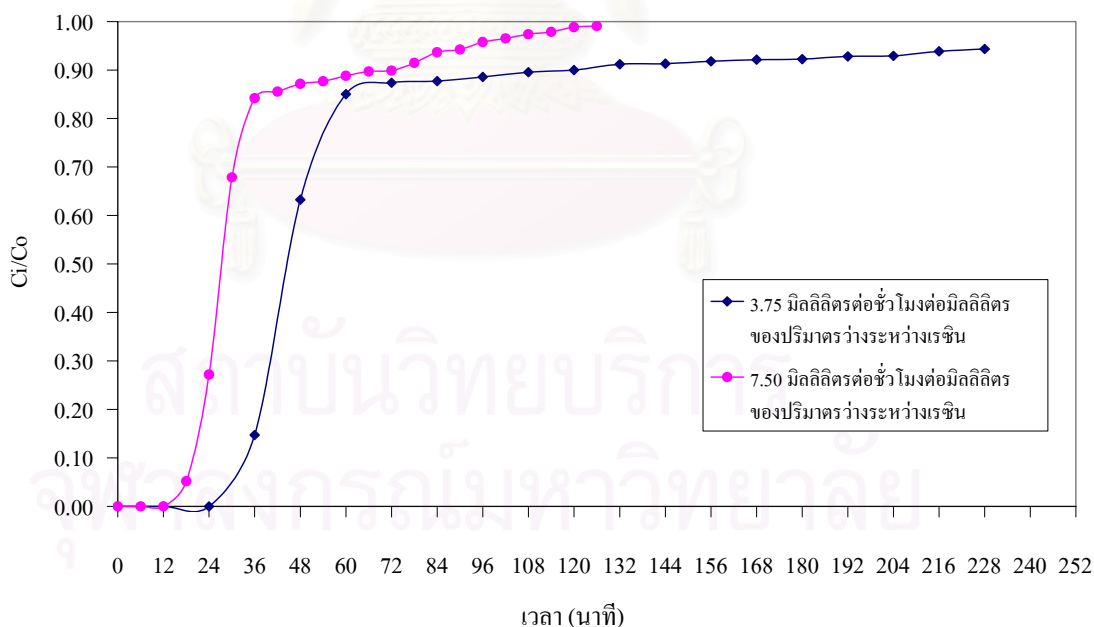


รูปที่ 4.26 Breakthrough curve ของการดูดซับกรรมนะนาจากสารละลายกรรมนะนากรดทางการค้าที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 5.00 ของคอลัมน์แลกเปลี่ยนไอออนที่อัตราการไหลต่างๆ

จากรูปที่ 4.26 พบว่าเมื่อเริ่มผ่านสารละลายเข้าคอลัมน์และเก็บสารละลายเป็นลำดับส่วน ความเข้มข้นของสารละลายที่เก็บได้จะมีค่าเท่ากับศูนย์และเมื่อเวลาผ่านไปจะเกิดการดูดซับ (adsorption) ระหว่างตัวถูกละลายในสารละลายกับเรซินและความเข้มข้นของสารละลายมีการเปลี่ยนแปลงโดยจะมีการเคลื่อนที่ตามความยาวคอลัมน์จากนั้นเรซินจะอิ่มตัวด้วยตัวถูกละลายและมีค่าคงที่โดยค่า C_t/C_0 จะมีค่าเข้าใกล้ 1 ซึ่งแสดงถึงสมดุลระหว่างความเข้มข้นของตัวถูกละลายใน

สารละลายกับเรซิน ที่อัตราการไหลเท่ากับ 3.75 มิลลิลิตรต่อชั่วโมงต่อมิลลิตรของปริมาตรว่างระหว่างเรซิน จะได้ค่า t_B และ t_E เท่ากับ 12 นาทีและ 252 นาที ตามลำดับ และที่ t_B เท่ากับ 12 นาทีจะมีปริมาณกรดมะนาวที่ถูกดูดซับเท่ากับ 0.29 กรัม ที่อัตราการไหลเท่ากับ 7.50 มิลลิลิตรต่อชั่วโมงต่อมิลลิตรของปริมาตรว่างระหว่างเรซิน จะได้ค่า t_B และ t_E เท่ากับ 18 นาทีและ 132 นาทีตามลำดับ และที่ t_B เท่ากับ 18 นาทีจะมีปริมาณกรดมะนาวที่ถูกดูดซับเท่ากับ 0.86 กรัม

สำหรับ Breakthrough curve ของการดูดซับกรดมะนาวในน้ำหมักกรดมะนาวที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 5.30 ด้วยคอลัมน์แลกเปลี่ยนไอออนที่อัตราการไหลเท่ากับ 3.75 และ 7.50 มิลลิลิตรต่อชั่วโมงต่อมิลลิตรของปริมาตรว่างระหว่างเรซิน ให้ผลดังตารางที่ จ.17 และ จ.18 (ภาคผนวก จ) ตามลำดับ และจากรูปที่ 4.27 พบว่าที่อัตราการไหลเท่ากับ 3.75 มิลลิลิตรต่อชั่วโมงต่อมิลลิตรของปริมาตรว่างระหว่างเรซินจะได้ค่า t_B และ t_E เท่ากับ 24 นาทีและ 228 นาทีตามลำดับ และที่ t_B เท่ากับ 24 นาทีจะมีปริมาณกรดมะนาวที่ถูกดูดซับเท่ากับ 0.56 กรัม และที่อัตราการไหลเท่ากับ 7.50 มิลลิลิตรต่อชั่วโมงต่อมิลลิตรของปริมาตรว่างระหว่างเรซิน จะได้ค่า t_B และ t_E เท่ากับ 12 นาทีและ 120 นาทีตามลำดับ และที่ t_B เท่ากับ 12 นาทีจะมีปริมาณกรดมะนาวที่ถูกดูดซับเท่ากับ 0.56 กรัม



รูปที่ 4.27 Breakthrough curve ของการดูดซับกรดมะนาวจากน้ำหมักกรดมะนาวที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 5.30 ของคอลัมน์แลกเปลี่ยนไอออนที่อัตราการไหลต่างๆ

เมื่อเปรียบเทียบอัตราการไหลที่ 3.75 และ 7.50 มิลลิลิตรต่อชั่วโมงต่อมิลลิลิตรของปริมาตรว่างระหว่างเรซิน ในการแยกกรดมะนาวในสารละลายทั้ง 2 ลักษณะ พบว่า breakthrough time จะลดลงเมื่ออัตราการไหลเพิ่มขึ้นและเมื่อเปรียบเทียบลักษณะกราฟพบว่าที่อัตราการไหลเท่ากับ 7.50 มิลลิลิตรต่อชั่วโมงต่อมิลลิลิตรของปริมาตรว่างระหว่างเรซิน กราฟที่ได้มีลักษณะชันกว่าและแคบกว่าที่อัตราการไหลเท่ากับ 3.75 มิลลิลิตรต่อชั่วโมงต่อมิลลิลิตรของปริมาตรว่างระหว่างเรซิน ซึ่งลักษณะของ breakthrough curve ที่ดีควรจะแคบและมีความชันมาก เนื่องจากค่าที่ได้จาก breakthrough curve จะนำไปพิจารณาเลือกอัตราการไหลที่เหมาะสมในการแยกไอออนและเพื่อลดพลังงานและค่าใช้จ่ายในขั้นตอนการแยกผลิตภัณฑ์ (Geankoplis, 1993)

4.10 ภาวะที่เหมาะสมสำหรับการชะกรดมะนาวออกจากคอลัมน์แลกเปลี่ยนไอออน

ทดลองชะกรดมะนาวออกจากคอลัมน์แลกเปลี่ยนไอออนที่ผ่านการดูดซับกรดมะนาวจากสารละลายกรดมะนาวเกรดทางการค้าและน้ำหมักกรดมะนาว เนื่องจากการหมักได้ควบคุมความเป็นกรดต่างของน้ำหมักด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ โซเดียมไอออนจะรวมตัวกับซิเตรทไอออนเป็นสารละลายโซเดียมซิเตรท และเมื่อนำไปแยกด้วยเรซินแลกเปลี่ยนไอออนที่เหนี่ยวนำไฮดรอกไซด์ไอออน โซเดียมไอออนในสารละลายโซเดียมซิเตรทจะแลกเปลี่ยนไอออนกับไฮดรอกไซด์ไอออนเกิดเป็นโซเดียมไฮดรอกไซด์ สำหรับซิเตรทไอออนจะดูดซับอยู่บนเรซิน เพื่อแยกให้ได้กรดมะนาวออกจากเรซินมาจึงนำสารละลายกรดซัลฟูริกมาใช้เป็นตัวชะ โดยทดลองแปรความเข้มข้นสารละลายกรดซัลฟูริก ได้ผลดังนี้

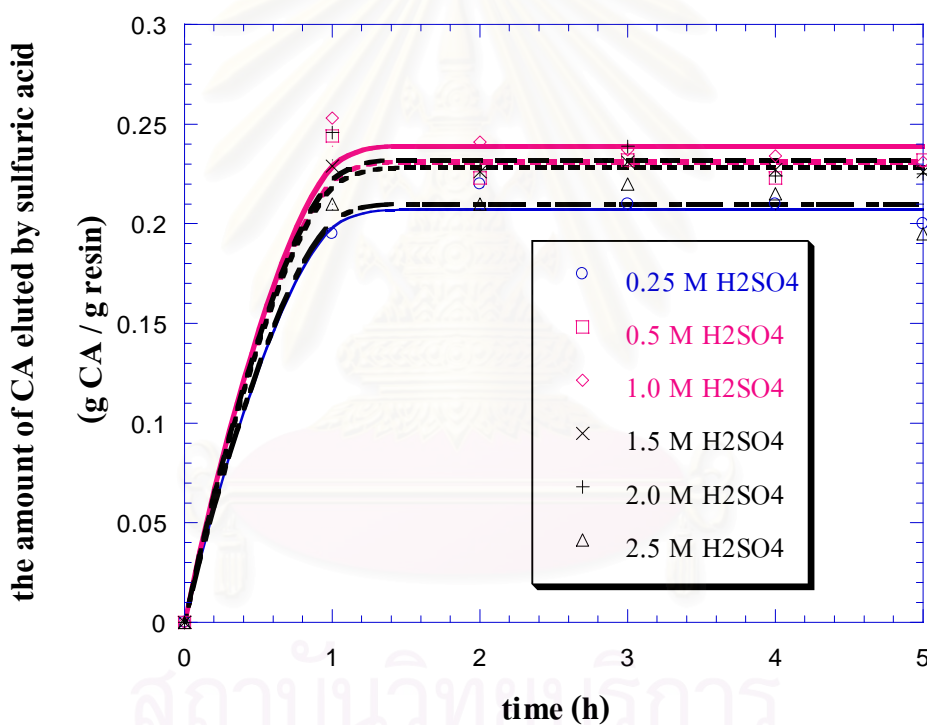
4.10.1 เวลาที่สมดุลของการชะกรดมะนาวออกจากเรซิน

หาเวลาที่สมดุลของการชะ เพื่อใช้คำนวณหาอัตราการไหลเบื้องต้นของสารละลายตัวชะในการผ่านเข้าคอลัมน์แลกเปลี่ยนไอออน โดยทดลองชะเรซินที่ผ่านการดูดซับกรดมะนาวจากสารละลายกรดมะนาวเกรดทางการค้าและน้ำหมักกรดมะนาว ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 5.00 และ 5.30 ตามลำดับ ที่เวลาต่างๆ กัน ตามวิธีทดลองข้อ 3.7.4.1 แปรความเข้มข้นสารละลายตัวชะเท่ากับ 0.25, 0.50, 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5 โมลาร์ เก็บตัวอย่างสารละลายทุก 1 ชั่วโมงเป็นเวลา 5 ชั่วโมง วิเคราะห์หาปริมาณกรดมะนาวด้วย HPLC วาดกราฟระหว่างปริมาณกรดมะนาวที่ชะได้กับระยะเวลาในการชะเพื่อหาเวลาที่สมดุลของการชะกรดมะนาวออกจากเรซิน ได้ผลดังนี้

4.10.1.1 สารละลายกรดมะนาวเกรดทางการค้าที่ค่าความเป็นกรดต่าง

เท่ากับ 5.00

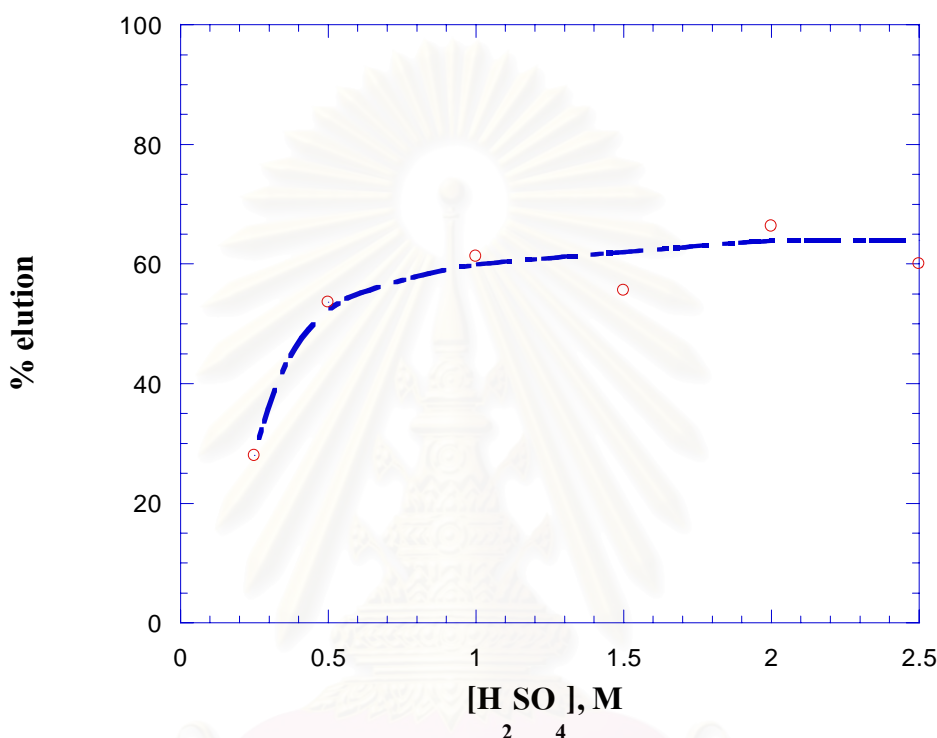
เวลาที่สมดุลของการชะกรดมะนาวเกรดทางการค้าที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 5.00 ให้ผลดังตารางที่ จ.19 (ภาคผนวก จ) และรูปที่ 4.28 แสดงให้เห็นว่าในช่วงชั่วโมงแรกของการชะ กรดมะนาวที่ถูกชะออกจากเรซินจะมีปริมาณเพิ่มขึ้นตามเวลาในการชะที่ทุกๆ ค่าความเข้มข้นของสารละลายตัวชะ จนถึงระยะเวลาหนึ่งพบว่าปริมาณกรดมะนาวที่ถูกชะออกจากเรซินมีค่าคงที่ นั่นคือเวลาที่สมดุลของการชะกรดมะนาวออกจากเรซิน ซึ่งจะเกิดสมดุลระหว่างอัตราการปล่อยและการดูดซับกรดมะนาวของเรซินดังที่ได้อธิบายไว้ในผลการทดลองข้อ 4.8.1



รูปที่ 4.28 ปริมาณกรดมะนาวในสารละลายกรดมะนาวเกรดทางการค้าที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 5.00 ที่ถูกชะด้วยสารละลายกรดซัลฟูริกที่มีความเข้มข้นต่างๆ ที่เวลาในการชะต่างๆกัน

พิจารณาปริมาณกรดมะนาวที่ถูกชะและเปอร์เซ็นต์การดูดซับดังแสดงในตารางที่ จ.20 (ภาคผนวก จ) และรูปที่ 4.29 สารละลายตัวชะที่มีความเข้มข้น 2.0 โมลาร์ สามารถชะกรดมะนาวออกจากเรซิน คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การชะสูงสุดเท่ากับ 66.32 เปอร์เซ็นต์ และที่ความเข้มข้น 1.0 และ 2.5 โมลาร์ให้เปอร์เซ็นต์การชะสูงสุดรองลงมาเท่ากับ 61.34 และ 60.00 เปอร์เซ็นต์

ตามลำดับ ดังนั้นในการเลือกความเข้มข้นสารละลายกรดซัลฟูริกที่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการชะกรดมะนาวในสารละลายกรดมะนาวเกรดทางการค้าออกจากเรซิน จึงเลือกที่ความเข้มข้น 1.0 โมลาร์เพราะให้เปอร์เซ็นต์การดูดซับที่ค่อนข้างสูงและเพื่อประหยัดสารละลายตัวชะในขั้นตอนการชะต่อไป

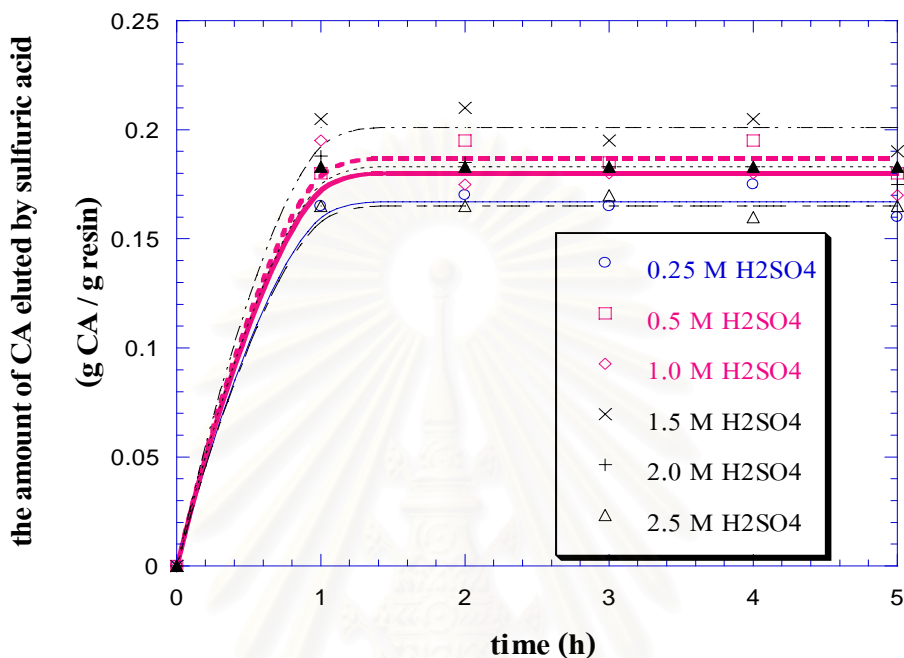


รูปที่ 4.29 เปอร์เซนต์การชะกรดมะนาวในสารละลายกรดมะนาวเกรดทางการค้าที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 5.00 ออกจากเรซินด้วยสารละลายกรดซัลฟูริกที่ความเข้มข้นต่างๆ

4.10.1.2 น้ำหมักกรดมะนาวที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 5.00

เวลาที่สมดุลของการชะกรดมะนาวในน้ำหมักกรดมะนาวที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 5.30 ให้ผลดังแสดงในตารางที่ จ.21 (ภาคผนวก จ) และรูปที่ 4.30 จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าลักษณะการชะกรดมะนาวด้วยสารละลายกรดซัลฟูริกที่ความเข้มข้นต่างๆ มีรูปแบบคล้ายกับการทดลองในข้อ 4.10.1.1 โดยพบว่าช่วงโมเมนต์แรกของการทดลองกรดมะนาวที่ถูกชะออกจากเรซินจะมีปริมาณเพิ่มขึ้นตามเวลาในการชะที่ทุกๆ ค่าความเข้มข้นของสารละลายตัวชะจนถึงระยะเวลาหนึ่งพบว่าปริมาณกรดมะนาวที่ถูกชะออกจากเรซินมีค่าคงที่ ซึ่งเป็นเวลาที่สมดุล

ของการชะกรดมะนาวออกจากเรซินและเกิดสมดุลระหว่างอัตราการปล่อยและการดูดซับกรดมะนาวของเรซินดังที่ได้อธิบายไว้ในผลการทดลองข้อ 4.8.1

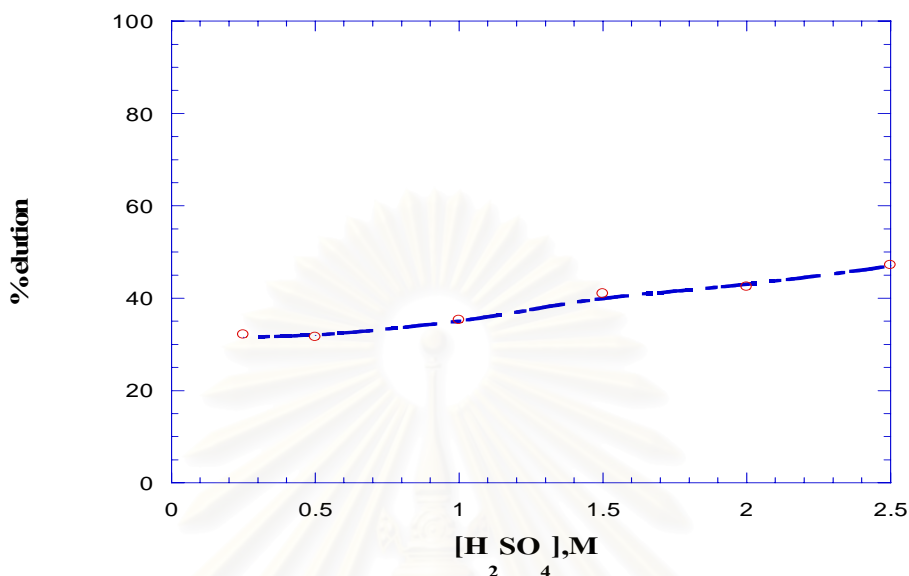


รูปที่ 4.30 ปริมาณกรดมะนาวในน้ำหมักกรดมะนาวที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 5.3 ที่ถูกชะด้วยสารละลายกรดซัลฟูริกที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่เวลาในการชะต่างๆกัน

พิจารณาปริมาณกรดมะนาวที่ถูกชะและเปอร์เซ็นต์การดูดซับดังแสดงในตารางที่จ.22 (ภาคผนวก จ) และรูปที่ 4.31 พบว่าสารละลายตัวชะที่ความเข้มข้น 2.5 โมลาร์ สามารถชะกรดมะนาวออกจากเรซิน คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การชะสูงสุดเท่ากับ 47.14 เปอร์เซ็นต์ และที่ความเข้มข้น 2.0 และ 1.5 โมลาร์ให้เปอร์เซ็นต์การชะสูงสุดรองลงมาเท่ากับ 42.44 และ 41.02 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ดังนั้นในการเลือกความเข้มข้นสารละลายกรดซัลฟูริกที่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการชะกรดมะนาวในน้ำหมักกรดมะนาวออกจากเรซินในขั้นตอนการหมักแบบ extractive fermentation จะเลือกใช้สารละลายกรดซัลฟูริกที่ความเข้มข้น 1.5 โมลาร์เพราะให้เปอร์เซ็นต์การดูดซับที่ค่อนข้างสูงและเพื่อประหยัดสารละลายตัวชะในขั้นตอนการชะ

4.10.2 อัตราการไหลที่เหมาะสมของสารละลายตัวชะ

จากผลการทดลองจากข้อ 4.10.1.1 และ 4.10.1.2 สามารถเลือกความเข้มข้นของตัวชะที่เหมาะสมคือ การชะกรดมะนาวในสารละลายกรดมะนาวกรดทางการค้า



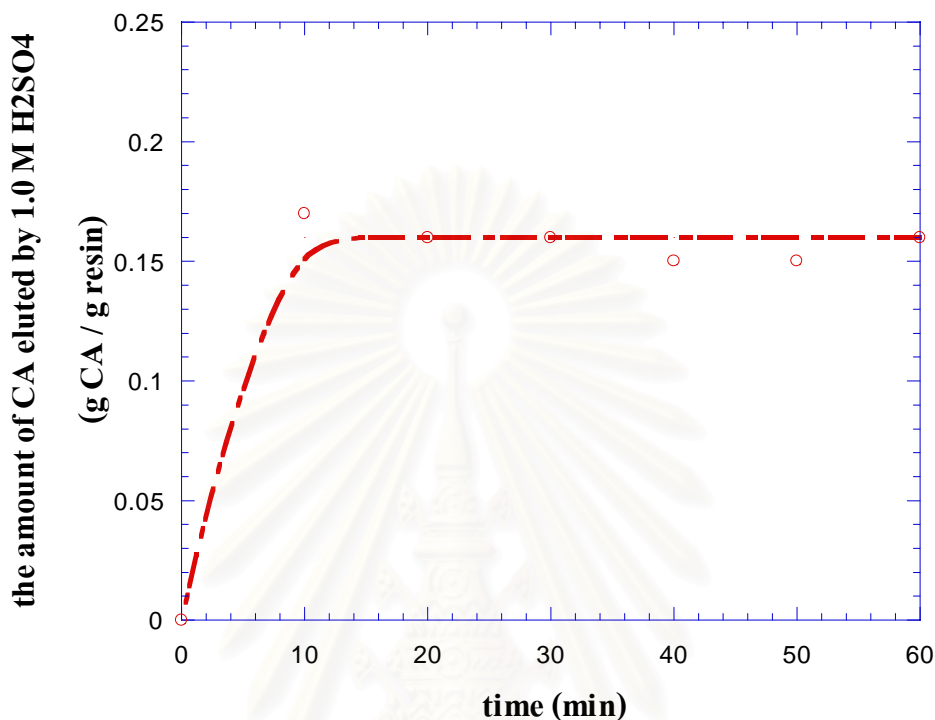
รูปที่ 4.31 เปอร์เซนต์การชะกรดมะนาวในน้ำหมักกรดมะนาวที่ค่าความเป็นกรดเท่ากับ 5.30 ออกจากเรซินด้วยสารละลายกรดซัลฟูริกที่ความเข้มข้นต่างๆ

และน้ำหมักกรดมะนาวเลือกใช้ความเข้มข้นสารละลายกรดซัลฟูริกเท่ากับ 1.0 และ 1.5 โมลาร์ ตามลำดับ เวลาที่สมดุลของการชะกรดมะนาวออกจากเรซินจะเกิดสมดุลระหว่างอัตราการปล่อยและการดูดซับกรดมะนาวของเรซินในช่วง 1 ชั่วโมงแรกของการชะ ดังนั้นเพื่อให้ได้ข้อมูลเบื้องต้นเพื่อนำไปคำนวณหาอัตราการไหลที่เหมาะสมของสารละลายกรดซัลฟูริกจึงทำการทดลองตามวิธีทดลองข้อ 3.7.4.1 โดยใช้สารละลายกรดซัลฟูริกที่ความเข้มข้น 1.0 และ 1.5 โมลาร์ในการชะกรดมะนาวในสารละลายกรดมะนาวเกรดทางการค้า และน้ำหมักกรดมะนาวออกจากเรซินตามลำดับ และเก็บตัวอย่างทุกๆ 10 นาทีเป็นเวลา 60 นาที วิเคราะห์หาปริมาณกรดมะนาวด้วย HPLC วาดกราฟระหว่างปริมาณกรดมะนาวที่ชะได้กับระยะเวลาในการชะให้ผลดังนี้

4.10.2.1 อัตราการไหลที่เหมาะสมในการชะกรดมะนาวในสารละลายกรดมะนาวเกรดทางการค้าที่ค่าความเป็นกรดเท่ากับ 5.00

เวลาที่สมดุลของการชะกรดมะนาวในสารละลายกรดมะนาวเกรดทางการค้าที่ค่าความเป็นกรดเท่ากับ 5.00 ออกจากเรซิน ให้ผลดังตารางที่ จ.23 (ภาคผนวก จ) และหาเวลาที่สมดุลของการชะกรดมะนาวจากกราฟในรูปที่ 4.32 โดยลากเส้นสัมผัสกราฟตามแนวตั้ง

และแนวนอน จุดที่เส้นสัมผัสตัดกันคือ เวลาที่สมดุลของการชะกษรคมะนาวออกจากเรซิน ซึ่งมีค่าเท่ากับ 8 นาที



รูปที่ 4.32 ปริมาณกรดมะนาวในสารละลายกรดมะนาวกรดทางการค้าที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 5.00 ที่ถูกชะออกจากเรซินด้วยสารละลายกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 1.0 โมลาร์ ที่เวลาในการชะต่างๆ

คำนวณอัตราการไหลของสารละลายกรดซัลฟูริก โดยอาศัยหลักว่าระยะเวลาที่สารละลายกรดซัลฟูริกสัมผัสกับเรซิน (contact time) ต้องมากกว่าหรือเท่ากับเวลาที่ถึงจุดอิ่มตัวของการชะกรดมะนาวออกจากเรซิน เพื่อให้ได้ประสิทธิภาพในการชะสูงสุด กำหนดหาอัตราการไหลได้ดังนี้

$$\text{อัตราการไหล (มิลลิลิตร/นาที)} = \frac{\text{ปริมาตรว่างระหว่างเรซิน}}{\text{ระยะเวลาที่สารละลายกรดซัลฟูริกสัมผัสกับเรซิน}}$$

โดยปริมาตรว่างระหว่างเรซินของคอลัมน์ที่ทดลองเท่ากับ 4.0 มิลลิลิตร เวลาที่ต่ำสุดที่สารละลายกรดซัลฟูริกสัมผัสกับเรซิน คือ 8.0 นาที

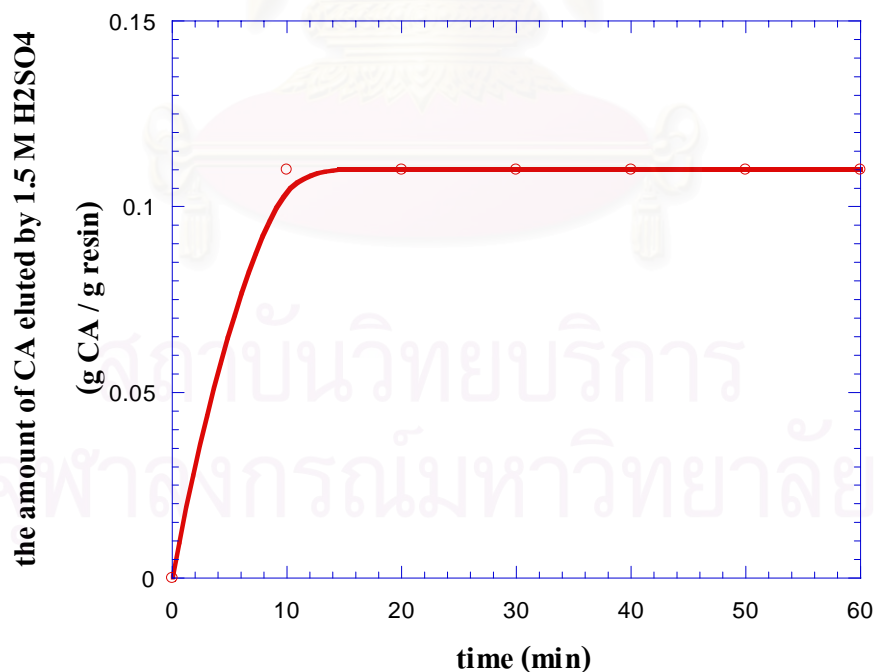
$$\begin{aligned} \text{อัตราการไหลของสารละลายกรดซัลฟูริก} &= 4/8 \\ &= 0.5 \text{ มิลลิลิตรต่อนาที} \end{aligned}$$

คิดอัตราการไหลในหน่วย space velocity ได้เท่ากับ 7.5 มิลลิลิตรต่อชั่วโมงต่อมิลลิลิตรของ ปริมาตรว่างระหว่างเรซิน

ดังนั้น ในการทดลองหาการชะกรดมะนาวในสารละลายกรดมะนาวเกรดทางการค้าที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 5.00 ออกจากคอลัมน์แลกเปลี่ยนไอออน ควรควบคุมอัตราการไหลของสารละลายกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 1.0 โมลาร์ให้ต่ำกว่าหรือเท่ากับ 7.5 มิลลิลิตรต่อ ชั่วโมงต่อมิลลิลิตรของปริมาตรว่างระหว่างเรซิน

4.10.2.2 อัตราการไหลที่เหมาะสมในการชะกรดมะนาวในน้ำหมักกรดมะนาวที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 5.30

เวลาที่สมดุลของตัวชะในการชะกรดมะนาวในน้ำหมักกรดมะนาวที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 5.30 ออกจากเรซิน ให้ผลดังตารางที่ จ.24 (ภาคผนวก จ) และหาเวลาที่ สมดุลของการชะกรดมะนาวจากกราฟในรูปที่ 4.33



รูปที่ 4.33 ปริมาณกรดมะนาวในน้ำหมักกรดมะนาวที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 5.30 ที่ถูกชะออกจากเรซินด้วยสารละลายกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 1.5 โมลาร์ ที่เวลาในการชะต่างๆ

ลากเส้นสัมผัสกราฟตามแนวตั้งและแนวนอน จุดที่เส้นสัมผัสตัดกันคือ เวลาที่ถึงจุดอิ่มตัวของการระดมมะนาวออกจากเรซิน ซึ่งมีค่าเท่ากับ 8 นาที

$$\begin{aligned} \text{อัตราการผลิตของสารละลายกรดซัลฟูริก} &= 4/8 \\ &= 0.5 \text{ มิลลิลิตรต่อนาที} \end{aligned}$$

คิดอัตราการผลิตในหน่วย space velocity ได้เท่ากับ 7.5 มิลลิลิตรต่อชั่วโมงต่อมิลลิลิตรของปริมาณว่างระหว่างเรซิน

ดังนั้น ในการทดลองการระดมมะนาวในน้ำหมักการระดมมะนาวที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 5.30 ออกจากคอลัมน์แลกเปลี่ยนไอออน ควรควบคุมอัตราการผลิตของสารละลายกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 1.5 โมลาร์ให้ต่ำกว่าหรือเท่ากับ 7.5 มิลลิลิตรต่อชั่วโมงต่อมิลลิลิตรของปริมาณว่างระหว่างเรซิน

4.11 การแยกการระดมมะนาวออกจากร้ำหมักด้วยคอลัมน์แลกเปลี่ยนไอออนควบคุมการหมักในระดับถึงหมักขนาด 2 ลิตร

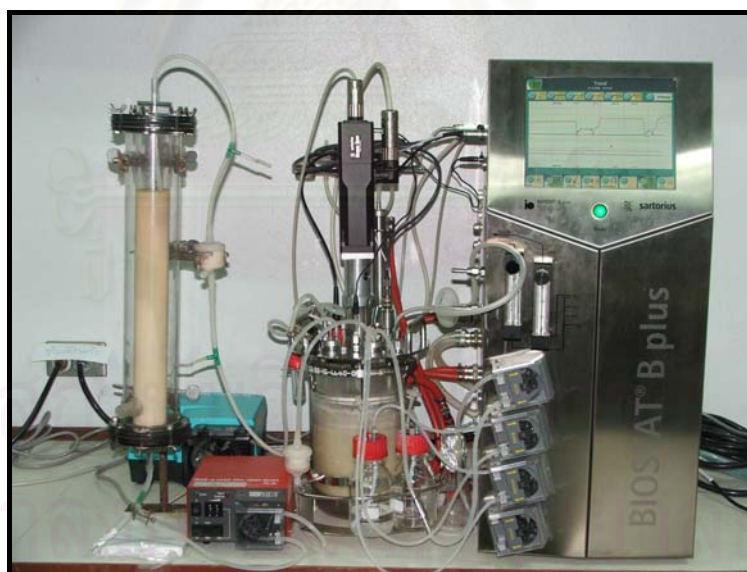
มีรายงานการผลิตการระดมมะนาวด้วยเชื้อ *A. niger* ควบคุมการแยกผลิตภัณฑ์ด้วยเรซินแลกเปลี่ยนไอออน (Extractive fermentation) พบว่าทำให้อัตราการผลิตการระดมมะนาวเพิ่มขึ้นจาก 0.338 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงเป็น 0.543 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และเชื้อใช้น้ำตาลเพิ่มขึ้นจาก 82.2 เปอร์เซ็นต์เป็น 94.8 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังลดระยะเวลาในการหมักให้สั้นลงจาก 8 วันเหลือเพียง 6 วัน (Jianglong และคณะ, 2000) ซึ่งข้อดีของการหมักแบบ extractive fermentation คือ ช่วยลดปฏิกิริยาการยับยั้งจากการสะสมของผลผลิต ทำให้ได้อัตราการผลิตเพิ่มขึ้นและลดของเหลือทิ้งจากกระบวนการแยกและสามารถนำมาใช้ควบคู่กับการผลิตแบบต่อเนื่องได้ ดังนั้นจึงมีความสนใจที่จะนำเอาวิธีการดังกล่าวมาใช้ในการผลิตการระดมมะนาวด้วยเซลล์ยีสต์

การทดลองนี้ได้นำคอลัมน์แลกเปลี่ยนไอออนมาใช้ควบคู่กับการหมักการระดมมะนาวในถึงหมักขนาด 2 ลิตร เพื่อนำมาช่วยเพิ่มผลผลิตโดยการลดปฏิกิริยาการยับยั้งด้วยผลิตภัณฑ์ (product inhibition) และลดปัญหา osmolarity ที่สูงเนื่องจากการรักษาความเป็นกรดต่างในถึงหมักด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ ดังนั้นจึงต้องมีการดึงโซเดียมซัลเฟตออกบางส่วนเพื่อควบคุมไม่ให้ภายในถึงหมักมีโซเดียมไอออนที่จับกับซัลเฟตไอออนมากเกินไป โดยจะดึงน้ำหมักที่อยู่ในรูปโซเดียมซัลเฟตจากถึงหมักจากนั้นแยกซัลเฟตไอออนด้วยคอลัมน์แลกเปลี่ยนไอออน โดยโซเดียมซัลเฟตจะแลกเปลี่ยนไอออนลบกับแคตไอออนบนเรซิน Dowex Marathon WBA ที่เหนี่ยวนำแคตไอออนคือ ไฮดรอกไซด์ไอออน โดยที่ซัลเฟตไอออนจะแลกเปลี่ยนไอออนและถูกจับบนเรซินในขณะที่โซเดียมไอออนจะจับกับไฮดรอกไซด์ไอออนได้โซเดียมไฮดรอกไซด์ น้ำหมักที่ถูกแยกซัลเฟตไอออนออกไปแล้วยังคงมีสารอาหารเหลืออยู่จึงนำมาเวียนกลับเข้าไปในถึงหมัก

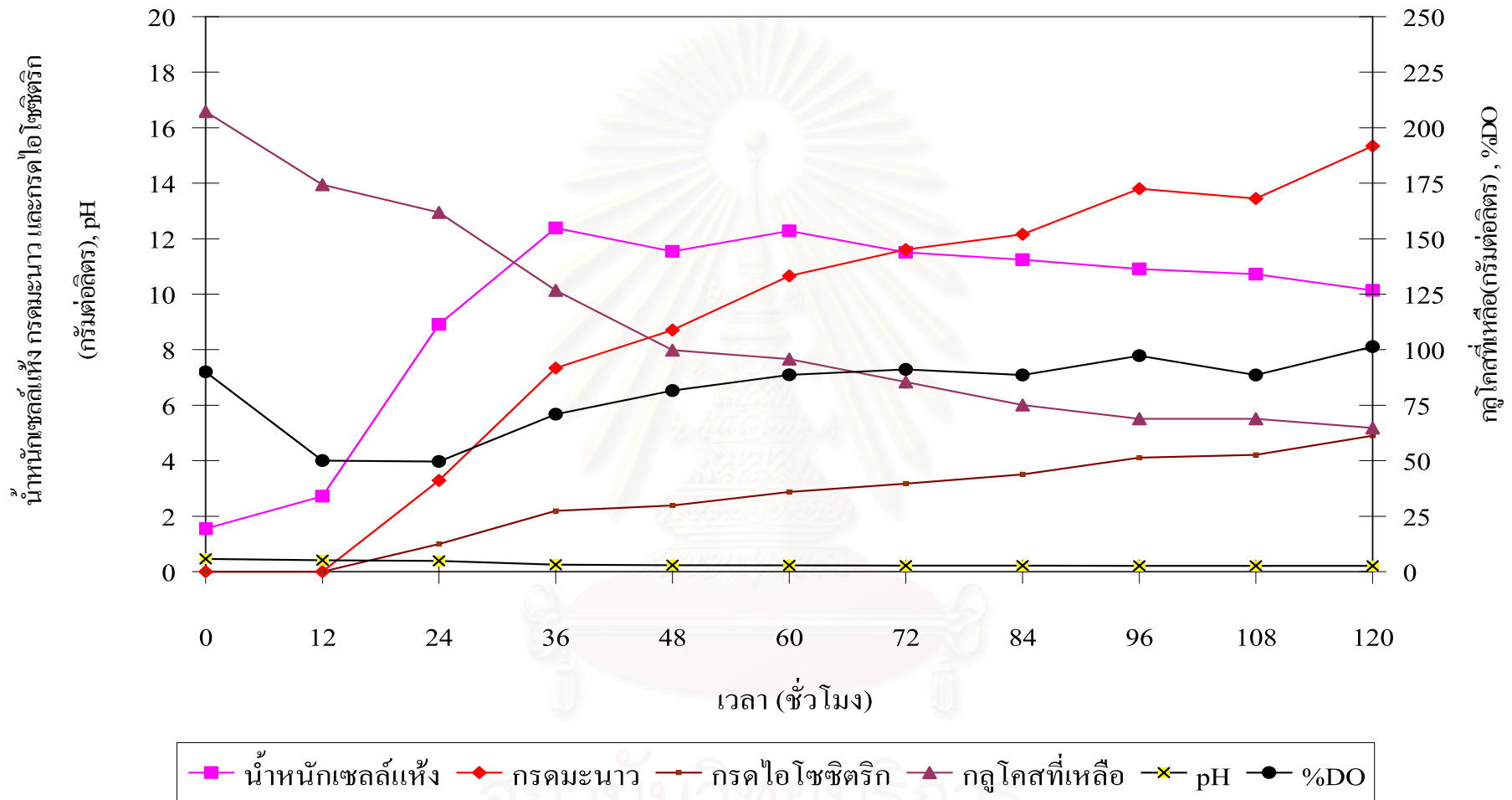
พร้อมกับโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่แยกได้เพื่อนำกลับไปควบคุมค่าความเป็นกรดต่างในถังหมัก เมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมักจึงนำคอลัมน์แลกเปลี่ยนไอออนมาทำการรีเจนเนอเรทด้วยสารละลายกรดซัลฟูริกเพื่อให้ได้กรรมนาวออกมา ให้ผลดังนี้

4.11.1 ควบคุมค่าความเป็นกรดต่างด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 40 (น้ำหนักต่อปริมาตร) หยุดควบคุมค่าความเป็นกรดต่างตั้งแต่ชั่วโมง 24

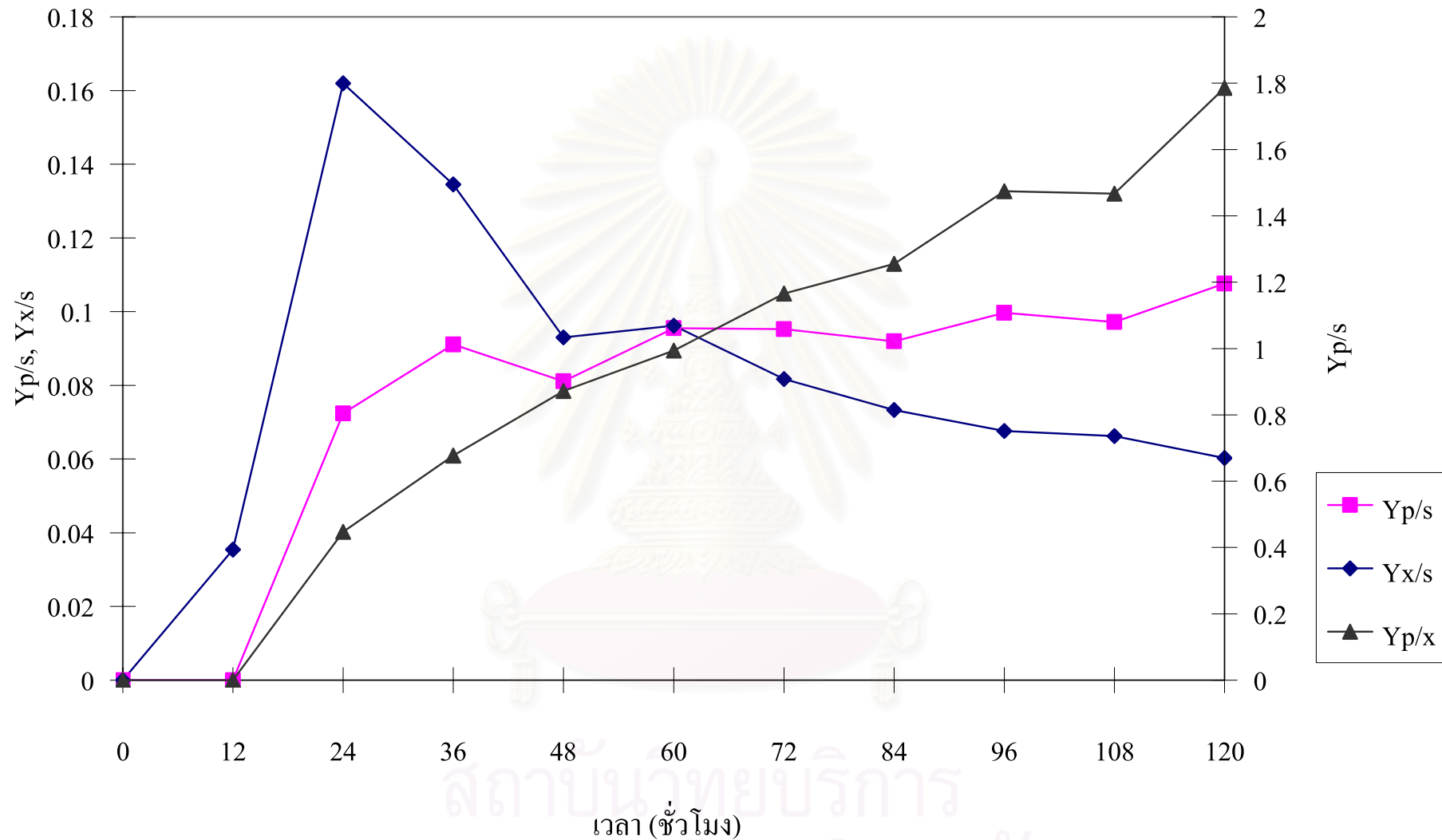
ทดลองตามวิธีข้อ 3.8 เลี้ยงเชื้อยีสต์เพื่อผลิตกรรมนาวในระดับถังหมักขนาด 2 ลิตร ควบคุมเปอร์เซ็นต์ออกซิเจนที่ละลายน้ำได้ให้คงที่เท่ากับ 50 เปอร์เซ็นต์และหยุดควบคุมค่าความเป็นกรดต่างตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 จากนั้นเริ่มดึงน้ำหมักออกจากถังหมักเข้าสู่คอลัมน์แลกเปลี่ยนไอออนโดยภายในคอลัมน์บรรจุเรซินปริมาณ 550 กรัม ซึ่งเรซินถูกรีเจนเนอเรทด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 2 โมลาร์แล้วล้างเรซินด้วยน้ำกลั่นจนน้ำล้างมีค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 7.0 จากนั้นเวียนน้ำหมักกลับเข้าสู่ถังหมักด้วยอัตราการไหลเท่ากับ 0.5 มิลลิลิตรต่ออนาที ดังแสดงในรูปที่ 4.34 เก็บตัวอย่างน้ำหมักเพื่อวิเคราะห์ปริมาณกรรมนาว กรดไอโซซิทริกและกลูโคสที่เหลือทุกๆ 12 ชั่วโมง ให้ผลดังตารางที่ จ.25 (ภาคผนวก จ) และรูปที่ 4.35 และ 4.36



รูปที่ 4.34 การผลิตกรรมนาวด้วยเชื้อ *C. oleophila* NNU-62 ในถังหมักขนาด 2 ลิตร รูปแบบการผลิตแบบ extractive fermentation



รูปที่ 4.35 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิติริก กลูโคสที่เหลือ ค่าความเป็นกรดต่าง และเปอร์เซ็นต์ออกซิเจนที่ละลายน้ำได้ ของการหมักที่เวลาต่างๆ เมื่อเลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* NNU-62 ในถังหมักขนาด 2 ลิตร รูปแบบการผลิตแบบ extractive fermentation หยุดควบคุมค่าความเป็นกรดต่างตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24



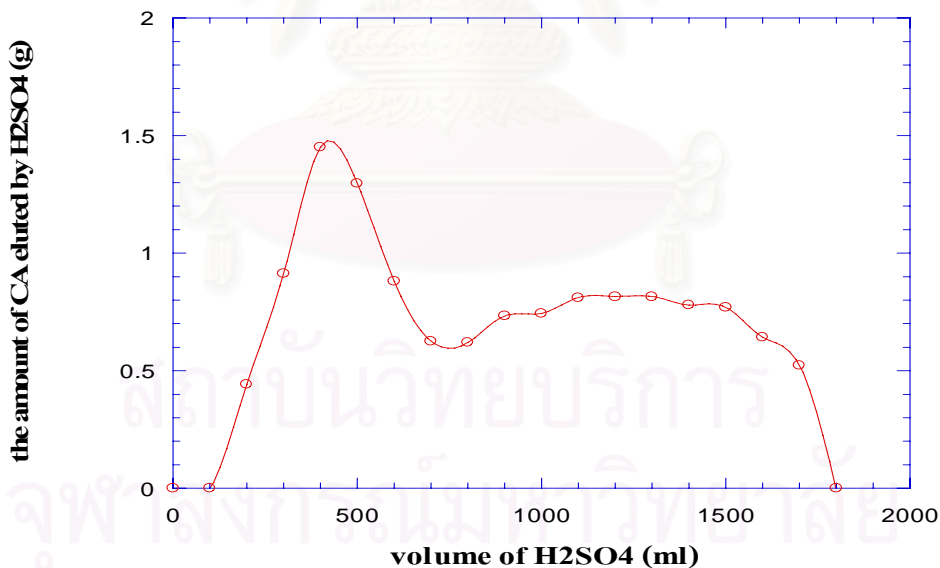
รูปที่ 4.36 ค่า $Y_{p/s}$, $Y_{x/s}$ และ $Y_{p/x}$ ที่ระยะเวลาต่างๆ ของการหมักเมื่อเลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* NNU-62 ในถังหมักขนาด 2 ลิตร รูปแบบการผลิตแบบ extractive fermentation หยุดควบคุมค่าความเป็นกรดต่างตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24

เนื่องจากการผลิตกรดมะนาวโดยยีสต์จะเกิดขึ้นหลังจากที่แหล่งไนโตรเจนในอาหารถูกใช้หมดแล้ว (Rane และ Simst, 1995) และจากผลการทดลองข้อ 4.7 ซึ่งเป็นการผลิตกรดมะนาวด้วยเซลล์อิสระในถังหมักขนาด 2 ลิตร พบว่าเชื้อเริ่มมีการผลิตกรดมะนาวตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 เป็นต้นไป ดังนั้นในการทดลองนี้จึงทำการเลี้ยงเชื้อโดยควบคุมค่าความเป็นกรดต่างตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 ถึง 24 เพื่อให้ภาวะในถังหมักเหมาะสมต่อการเจริญและเชื้อสามารถใช้แหล่งไนโตรเจนจนหมดจากผลการทดลองพบว่าเชื้อจะเจริญเข้าสู่ช่วงกึ่งกลางของการเจริญแบบทวีคูณ (mid-log phase) ในชั่วโมงที่ 24 จากนั้นเริ่มดึงน้ำหมักออกจากถังหมักโดยเซลล์จะถูกกรองภายในถังหมักโดยผ่าน spinfilter ที่มีขนาดรูพรุนเท่ากับ 20 ไมโครเมตรเพื่อควบคุมไม่ให้ปริมาณเซลล์ในถังหมักลดลงซึ่งพบว่าหลังจากชั่วโมงที่ 24 น้ำหนักเซลล์แห้งจะเพิ่มขึ้นเล็กน้อยและคงที่จนสิ้นสุดการทดลองและน้ำหมักก่อนที่จะเข้าสู่คอลัมน์แลกเปลี่ยนไอออนจะผ่านตัวกรองขนาด 0.45 และ 0.20 ไมโครเมตรเพื่อกำจัดอนุภาคขนาดเล็กและสารแขวนลอยต่างๆ แล้วนำเข้ากระบวนการแลกเปลี่ยนไอออน ภาวะที่ใช้ในแยกกรดมะนาวคือ ที่อัตราการไหล 7.50 มิลลิลิตรต่อชั่วโมงต่อมิลลิลิตรของปริมาตรว่างระหว่างเรซิน ที่อุณหภูมิห้อง หลังจากที่เราเริ่มกระบวนการแลกเปลี่ยนไอออนจะหยุดป้อนสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ น้ำหมักที่ผ่านการแลกเปลี่ยนไอออนในคอลัมน์แล้วจะถูกเวียนกลับเข้าไปในถังหมักเพื่อให้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ได้จากการแลกเปลี่ยนไอออนเป็นตัวปรับค่าความเป็นกรดต่างในถังหมักแต่เนื่องจากสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ได้จากการแลกเปลี่ยนไอออนในคอลัมน์มีปริมาณน้อยไม่สามารถควบคุมค่าความเป็นกรดต่างได้อีกทั้งกรดมะนาวที่ผลิตได้มีความเข้มข้นสูงขึ้นเรื่อยๆ ทำให้ภาวะในถังหมักไม่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อซึ่งค่าความเป็นกรดต่างในถังหมักจะลดลงตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 และเมื่อสิ้นสุดการทดลองมีค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 2.64

พิจารณาค่า $Y_{p/s}$ มีค่าเพิ่มขึ้นตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 ซึ่งเซลล์อยู่ในระยะเจริญแบบทวีคูณและมีการใช้กลูโคสเพื่อการเจริญและผลิตกรดมะนาว เมื่อสิ้นสุดการหมักกลูโคสที่เหลือในถังหมักมีค่าลดลงจากเริ่มต้นและกรดมะนาวมีค่าเพิ่มขึ้นดังนั้นค่า $Y_{p/s}$ จึงมีค่าเพิ่มขึ้นตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 จนสิ้นสุดการหมัก เนื่องจากการทดลองนี้ได้หยุดควบคุมค่าความเป็นกรดต่างตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 ซึ่งเซลล์จะเริ่มเข้าสู่ระยะการเจริญแบบคงที่ และอัตราการแลกเปลี่ยนไอออนมีค่าต่ำกว่าอัตราการผลิตกรดมะนาวจึงทำให้ภาวะในถังหมักไม่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเชื้อแต่เชื้อยังสามารถผลิตกรดมะนาวได้ ดังนั้นค่า $Y_{p/x}$ ที่ได้จึงมีค่าเพิ่มขึ้นตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 จากนั้นจะมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนสิ้นสุดการหมัก สำหรับค่า $Y_{x/s}$ มีค่าเพิ่มขึ้นตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 และมีค่าสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 24 จากนั้นจะลดลงจนสิ้นสุดการทดลองอาจเนื่องมาจากเมื่อหยุดควบคุมค่าความเป็นกรดต่างในถังหมักทำให้ภาวะไม่เหมาะสมต่อการเจริญ เซลล์จึงไม่เจริญเพิ่มอีกเป็นผลให้ค่า $Y_{x/s}$ ลดลง เมื่อสิ้นสุดการหมักให้อัตราการผลิตเท่ากับ 0.128 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงซึ่งมีค่าต่ำกว่าอัตราการผลิตกรดมะนาวแบบที่ไม่แยกระหว่างการหมักตามผลการทดลองข้อ 4.7 (อัตราการผลิตเท่ากับ 0.615

กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง) ทั้งนี้อาจเนื่องจากการดึงผลิตภัณฑ์ออกจากถังหมักน้อยไปจึงไม่สามารถลดปัญหา osmolarity ที่สูงได้ และสาเหตุที่ไม่สามารถดึงผลิตภัณฑ์ออกมาได้นั้นเพราะอัตราการไหลของน้ำหมักเข้าคอลัมน์และเวียนกลับน้ำหมักเข้าไปควบคุมค่าความเป็นกรดต่างในถังหมักค่อนข้างช้าจึงทำให้ไม่สามารถแยกกรดมะนาวออกมาให้สัมพันธ์กับอัตราการผลิตกรดมะนาวในถังหมักได้ ซึ่งในการทดลองขั้นต่อไปจะศึกษาการเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ในการปรับค่าความเป็นกรดต่างในถังหมัก

ในส่วนของคอลัมน์แลกเปลี่ยนไอออน เมื่อสิ้นสุดการหมักนำคอลัมน์แลกเปลี่ยนไอออนมาชะด้วยภาวะที่เหมาะสมตามผลการทดลองข้อ 4.10 สารละลายตัวชะที่ใช้คือ สารละลายกรดซัลฟริกความเข้มข้น 1.5 โมลาร์ อัตราการไหลเท่ากับ 7.50 มิลลิลิตรต่อชั่วโมงต่อมิลลิลิตรของปริมาตรว่างระหว่างเรซิน ที่อุณหภูมิห้อง และเพื่อลดระยะเวลาในขั้นตอนการแยกและรีเจนเนอเรทคอลัมน์ ในขั้นตอนการชะจึงทำการชะแบบ fast step โดยทำการผ่านสารละลายกรดซัลฟริกเข้าคอลัมน์อย่างรวดเร็วและเก็บสารละลายที่ถูกชะเป็นลำดับส่วน นำมาวิเคราะห์หาความเข้มข้นกรดมะนาวด้วยวิธี HPLC ให้ผลดังตารางที่ จ.26 (ภาคผนวก จ) และรูปที่ 4.37 แล้วคำนวณหาปริมาณกรดมะนาวที่ชะได้ทั้งหมด



รูปที่ 4.37 ปริมาณกรดมะนาวที่ถูกชะด้วยสารละลายกรดซัลฟริกความเข้มข้น 1.5 โมลาร์ เมื่อทำการผลิตกรดมะนาวแบบ extractive fermentation ที่ควบคุมค่าความเป็นกรดต่างด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 40 (น้ำหนักต่อปริมาตร) หยุดควบคุมค่าความเป็นกรดต่างตั้งแต่ชั่วโมง 24

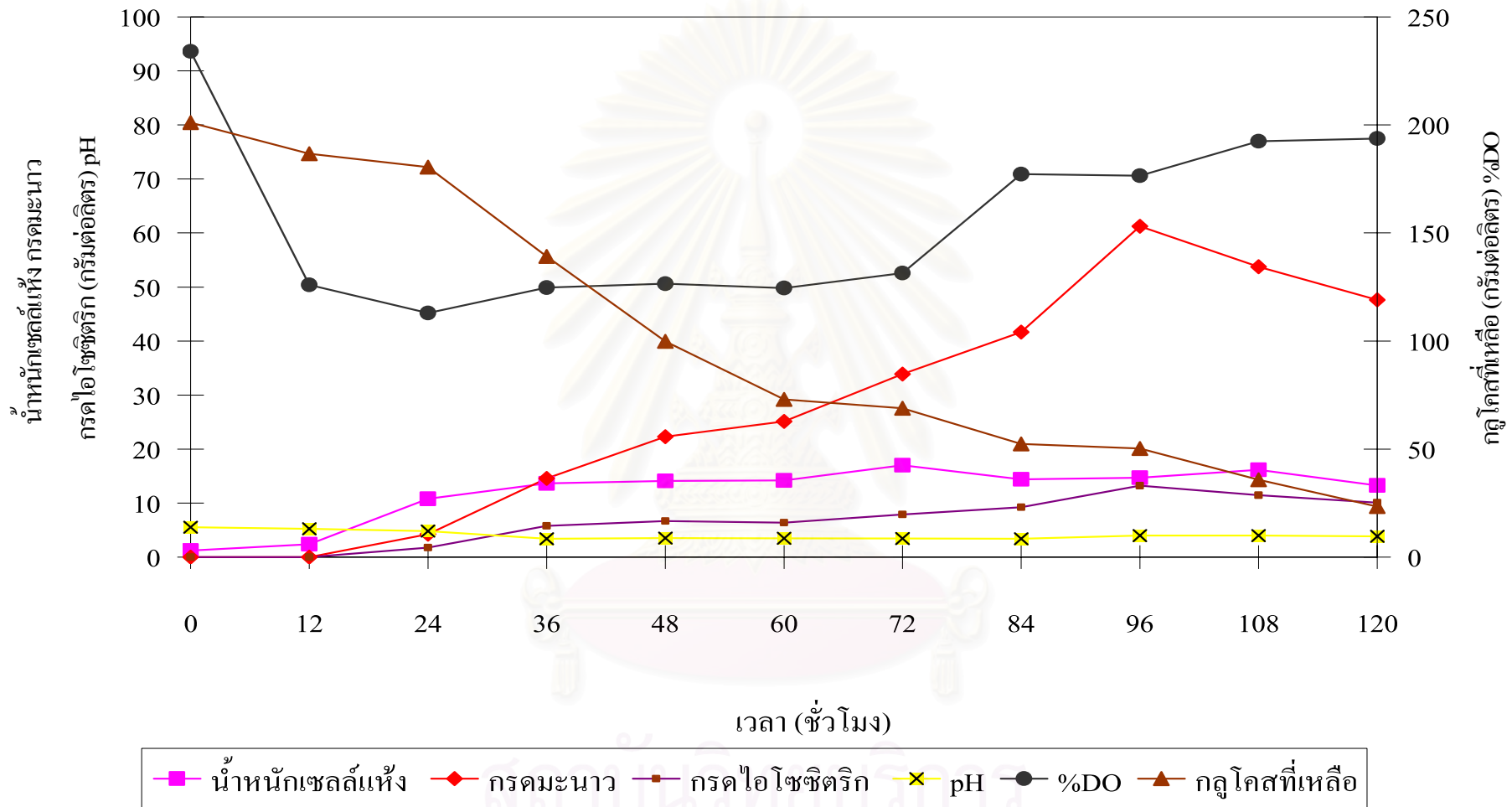
ในขั้นตอนการชะนี้สารละลายกรดซัลฟูริกจะแตกตัวได้ซัลเฟตไอออน (SO_4^{2-}) และไฮโดรเจนไอออน (H^+) ซัลเฟตไอออนจะเข้าแลกเปลี่ยนไอออนกับแคตไอออนที่เป็น ซิเตรทไอออน และไฮโดรเจนไอออนจะเข้าจับกับซิเตรทไอออนได้เป็นกรดมะนาวและถูกชะ ออกมา ในขั้นตอนนี้พบว่าปริมาณกรดมะนาวที่ชะได้ทั้งหมดเท่ากับ 12.87 กรัมและปริมาณ สารละลายตัวชะที่ใช้เท่ากับ 1,800 มิลลิลิตร

ปริมาณกรดมะนาวที่ได้จากการหมักในถังหมักเท่ากับ 16.26 กรัม และปริมาณ กรดมะนาวที่ได้จากการดูดซับด้วยคอลัมน์แลกเปลี่ยนไอออนเท่ากับ 12.87 กรัม ดังนั้นปริมาณกรด มะนาวทั้งหมดที่ได้จากกระบวนการหมักแบบ extractive fermentation โดยหยุดควบคุมค่าความ เป็นกรดต่างตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 เท่ากับ 29.13 กรัม

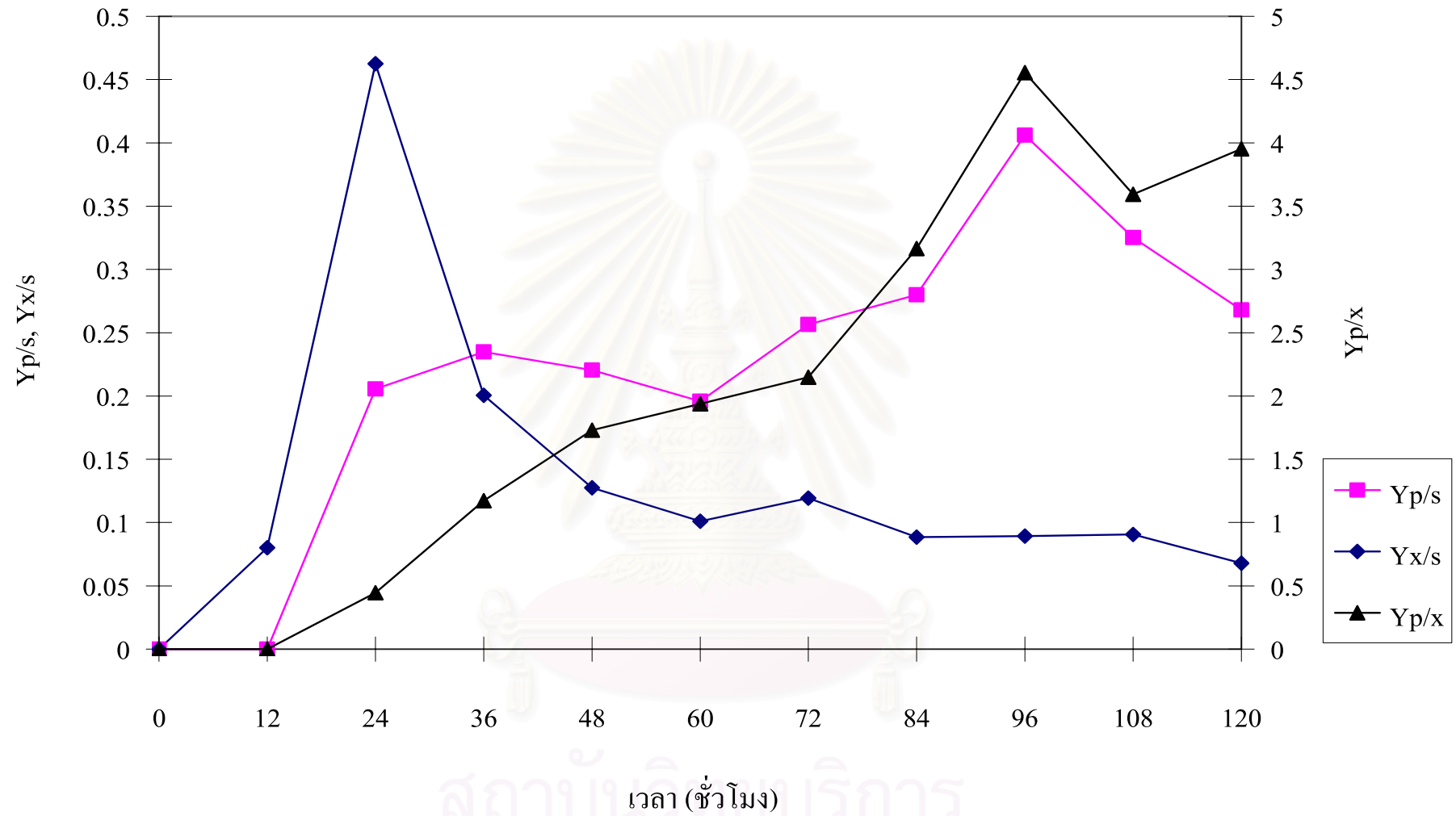
4.11.2 ควบคุมค่าความเป็นกรดต่างด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความ เข้มข้นร้อยละ 40 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ทุกๆ 12 ชั่วโมงจนสิ้นสุดการทดลอง

จากผลการทดลองข้อ 4.11.1 เมื่อหยุดควบคุมค่าความเป็นกรดต่างตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 และดึงสารละลายโซเดียมซิเตรทออกจากถังหมักเพื่อทำการแยกด้วยเรซินและเวียนน้ำหมักเข้า ถังหมักพบว่าอัตราการแยกกรดมะนาวไม่สัมพันธ์กับอัตราการผลิตกรดมะนาวในถังหมัก ทำให้ ภาวะในถังหมักไม่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อจึงทำให้อัตราการผลิตกรดมะนาวมีค่าต่ำ อีกทั้ง สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ได้จากการแยกด้วยเรซินมีปริมาณไม่เพียงพอที่จะช่วยปรับค่า ความเป็นกรดต่างในถังหมัก นอกจากนี้เรซินก่อนนำไปใช้ได้ทำการรีเจนเนอเรทด้วยสารละลาย โซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 2 โมลาร์ แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นจนน้ำล้างมีค่าความเป็นกรดต่าง เท่ากับ 7.00 ทำให้ภายในคอลัมน์แลกเปลี่ยนไอออนจึงมีค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 7.00 ด้วย เป็น ผลให้ภาวะที่ใช้ในการแยกกรดมะนาวไม่เป็นไปตามที่ได้ศึกษามา คือ เรซิน Dowex Marathon WBA จะมีความเหมาะสมในการแยกกรดมะนาวที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 5.00

ดังนั้นในการทดลองนี้ได้ทำการควบคุมค่าความเป็นกรดต่างตั้งแต่เริ่มการหมัก จนถึงชั่วโมงที่ 24 จากนั้นหยุดป้อนสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์แล้วเริ่มดึงน้ำหมักออกจากถัง หมักเข้าสู่คอลัมน์แลกเปลี่ยนไอออนโดยภายในคอลัมน์บรรจุเรซินปริมาณ 550 กรัม และทำการรี เจนเนอเรทเรซินด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 2 โมลาร์แล้วเวียนน้ำหมักกลับ เข้าสู่ถังหมักด้วยอัตราการไหลเท่ากับ 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที และทำการปรับค่าความเป็นกรดต่างใน ถังหมักทุกๆ 12 ชั่วโมงด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ได้จากการเตรียม เก็บตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมง นำน้ำหมักมาวิเคราะห์หาปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิเตรริก และ กลูโคสที่เหลือ ให้ผลดัง ตารางที่ จ.27 (ภาคผนวก จ) และรูปที่ 4.38 และ 4.39



รูปที่ 4.38 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดอะซิติก กรดไอโซซิทริก กลูโคสที่เหลือ ค่าความเป็นกรดต่าง และเปอร์เซ็นต์ออกซิเจนที่ละลายน้ำได้ ของการหมักที่เวลาต่างๆ เมื่อเลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* NNU-62 ในถังหมักขนาด 2 ลิตร รูปแบบการผลิตแบบ extractive fermentation ควบคุมค่าความเป็นกรดต่างๆ 12 ชั่วโมง



รูปที่ 4.39 ค่า $Y_{p/s}$, $Y_{x/s}$ และ $Y_{p/x}$ ที่ระยะเวลาต่างๆ ของการหมักเมื่อเลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* NNU-62 ในถังหมักขนาด 2 ลิตร รูปแบบการผลิตแบบ extractive fermentation ควบคุมค่าความเป็นกรดต่างๆ ทุกๆ 12 ชั่วโมง

จากผลการทดลองในส่วนของการหมักหลังจากชั่วโมงที่ 24 เมื่อหยุดปรับค่าความเป็นกรดค้างแล้ว เริ่มดึงน้ำหมักออกจากถังหมักและเวียนน้ำหมักกลับเข้าถังหมักเพื่อให้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ได้จากการแลกเปลี่ยนไอออนไปปรับค่าความเป็นกรดค้างพบว่าค่าความเป็นกรดค้างในถังหมักมีค่าอยู่ในช่วง 3-4 และเมื่อป้อนสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ได้จากการเตรียมทุกๆ 12 ชั่วโมงพร้อมกับการเก็บตัวอย่างจนถึงที่สุดการทดลองพบว่าภาวะในถังหมักยังไม่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ โดยเชื้อจะเริ่มเจริญเพิ่มขึ้นตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 จากนั้นน้ำหมักเซลล์แห้งจะเริ่มคงที่ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 36 และเชื้อเริ่มมีการผลิตกรดอะมิโนตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 และผลิตกรดอะมิโนได้สูงสุดเท่ากับ 61.25 กรัมต่อลิตรที่ชั่วโมง 96

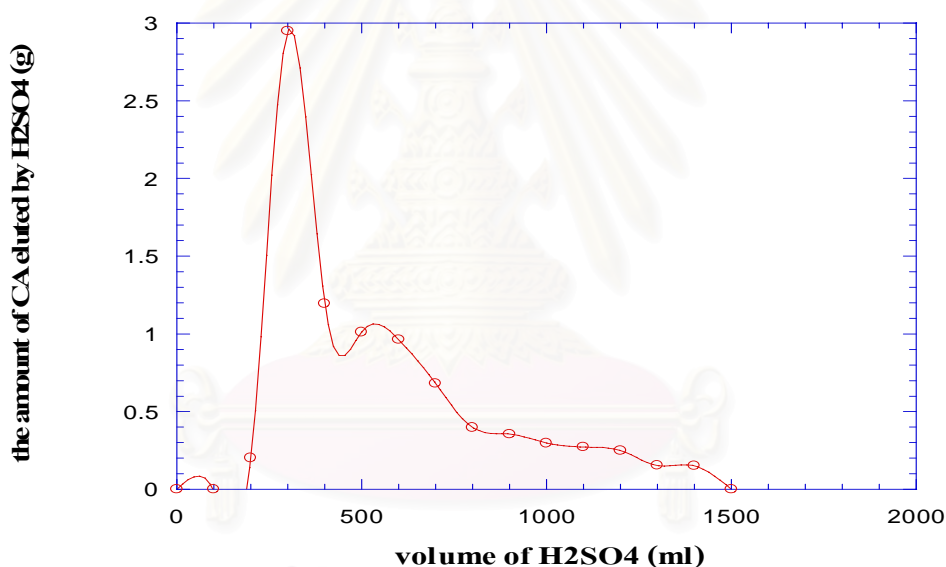
พิจารณาค่า $Y_{p/s}$ พบว่ามีค่ามากกว่าในผลการทดลองข้อ 4.11.1 อาจเนื่องมาจากการทดลองนี้ได้ควบคุมค่าความเป็นกรดค้างทุกๆ 12 ชั่วโมง ทำให้เชื้อเจริญได้เพิ่มขึ้นและสามารถใช้กลูโคสเพื่อผลิตกรดอะมิโนได้เพิ่มขึ้นด้วย เมื่อสิ้นสุดการหมักกลูโคสที่เหลือในถังหมักเหลือน้อยกว่าในผลการทดลองข้อ 4.11.1 ค่า $Y_{p/x}$ มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเช่นเดียวกับผลการทดลองข้อ 4.11.1 แต่ให้ค่าสูงกว่าอาจเนื่องจากในผลการทดลองนี้มีปริมาณเซลล์มากกว่าดังนั้นจึงสามารถผลิตกรดอะมิโนได้มากกว่า สำหรับค่า $Y_{x/s}$ ก็ให้ค่าสูงกว่าเช่นกันอาจเกิดจากปริมาณเซลล์ที่มากกว่า ดังนั้นความสามารถในการใช้น้ำตาลเพื่อผลิตเซลล์จึงมีมากกว่าด้วย เมื่อสิ้นสุดการหมักได้อัตราการผลิตกรดอะมิโน 0.397 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงซึ่งสูงกว่าผลการทดลองข้อ 4.11.1

เมื่อสิ้นสุดการหมักนำคอลลิมน์แลกเปลี่ยนไอออนมาชะด้วยภาวะที่เหมาะสมตามผลการทดลองข้อ 4.10 นำสารละลายที่ผ่านการชะมาวิเคราะห์หาความเข้มข้นกรดอะมิโนด้วยวิธี HPLC ให้ผลดังแสดงในตารางที่ จ.28 (ภาคผนวก จ) และรูปที่ 4.40 กำหนดหาปริมาณกรดอะมิโนที่ชะได้ พบว่าปริมาณกรดอะมิโนที่ชะออกจากคอลลิมน์เท่ากับ 8.89 กรัมและปริมาตรสารละลายตัวชะที่ใช้เท่ากับ 1,500 มิลลิลิตร ปริมาณกรดอะมิโนที่ได้จากการหมักในถังหมักเท่ากับ 57.16 กรัม ดังนั้นปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมดที่ได้จากกระบวนการหมักแบบ extractive fermentation ที่ควบคุมค่าความเป็นกรดค้างทุกๆ 12 ชั่วโมงจากสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่เตรียมไว้ร่วมกับที่ได้จากการแยกด้วยคอลลิมน์แลกเปลี่ยนไอออน เท่ากับ 66.05 กรัม

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณกรดอะมิโนกับผลการทดลองข้อ 4.11.1 พบว่าปริมาณกรดอะมิโนที่ชะได้ในการทดลองนี้มีปริมาณน้อยกว่าแต่ปริมาณกรดอะมิโนที่ผลิตได้ในถังมีค่าเพิ่มขึ้นจาก 16.26 กรัมได้เป็น 57.16 กรัม และปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมดเพิ่มขึ้นจาก 29.13 กรัมได้เป็น 66.05 กรัม

เนื่องจากการทดลองนี้ได้ทำการปรับค่าความเป็นกรดค้างในถังหมักทุกๆ 12 ชั่วโมงด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ได้จากการเตรียมทำให้ปริมาณกรดอะมิโนในถังหมักเพิ่มขึ้นอาจเป็นเพราะเมื่อเชื้อมีการผลิตกรดอะมิโนออกมาในรูปของซีเตรทไอออน สารละลาย

โซเดียมไฮดรอกไซด์ซึ่งจะแตกตัวได้โซเดียมไอออนและไฮดรอกไซด์ไอออน โดยโซเดียมไอออนจะเข้าจับกับซิเตรทไอออนได้เป็นโซเดียมซิเตรท จะไปช่วยลดปริมาณของซิเตรทไอออนทำให้เชื้อต้องผลิตซิเตรทไอออนเพิ่มขึ้นเพื่อให้อยู่ในสภาพสมดุลของการสร้างกรดมะนาวจึงทำให้ได้กรดมะนาวเพิ่มมากขึ้น สำหรับการแยกด้วยคอลัมน์ในการทดลองนี้ได้ปริมาณกรดมะนาวน้อยกว่าผลการทดลองข้อ 4.11.1 เกิดจากภาวะในคอลัมน์ไม่เหมาะสมต่อการแยกกรดมะนาวเพราะภายในคอลัมน์บรรจุด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 2 และเรซินถูกริเจนเนอร์ด้วยสารละลายชนิดเดียวกัน ทำให้ภาวะภายในถังหมักมีค่าความเป็นกรดต่างสูง จึงทำให้การแลกเปลี่ยนไอออนไม่เป็นไปตามขีดความสามารถของเรซินทำให้ประสิทธิภาพในการแยกกรดมะนาวลดลงด้วย (Geankoplis, 1993)



รูปที่ 4.40 ปริมาณกรดมะนาวที่ถูกชะด้วยสารละลายกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 1.5 โมลาร์ เมื่อทำการผลิตกรดมะนาวแบบ extractive fermentation ที่ควบคุมค่าความเป็นกรดต่างด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 40 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ทุกๆ 12 ชั่วโมง

4.11.3 ควบคุมค่าความเป็นกรดต่างด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 40 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 จนถึงสิ้นสุดการทดลอง

จากผลการทดลองข้อ 4.11.2 เมื่อทำการปรับค่าความเป็นกรดต่างทุกๆ 12 ชั่วโมงด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่เตรียมไว้ทำให้น้ำหนักเซลล์แห้งเพิ่มขึ้นและมีการผลิตกรด

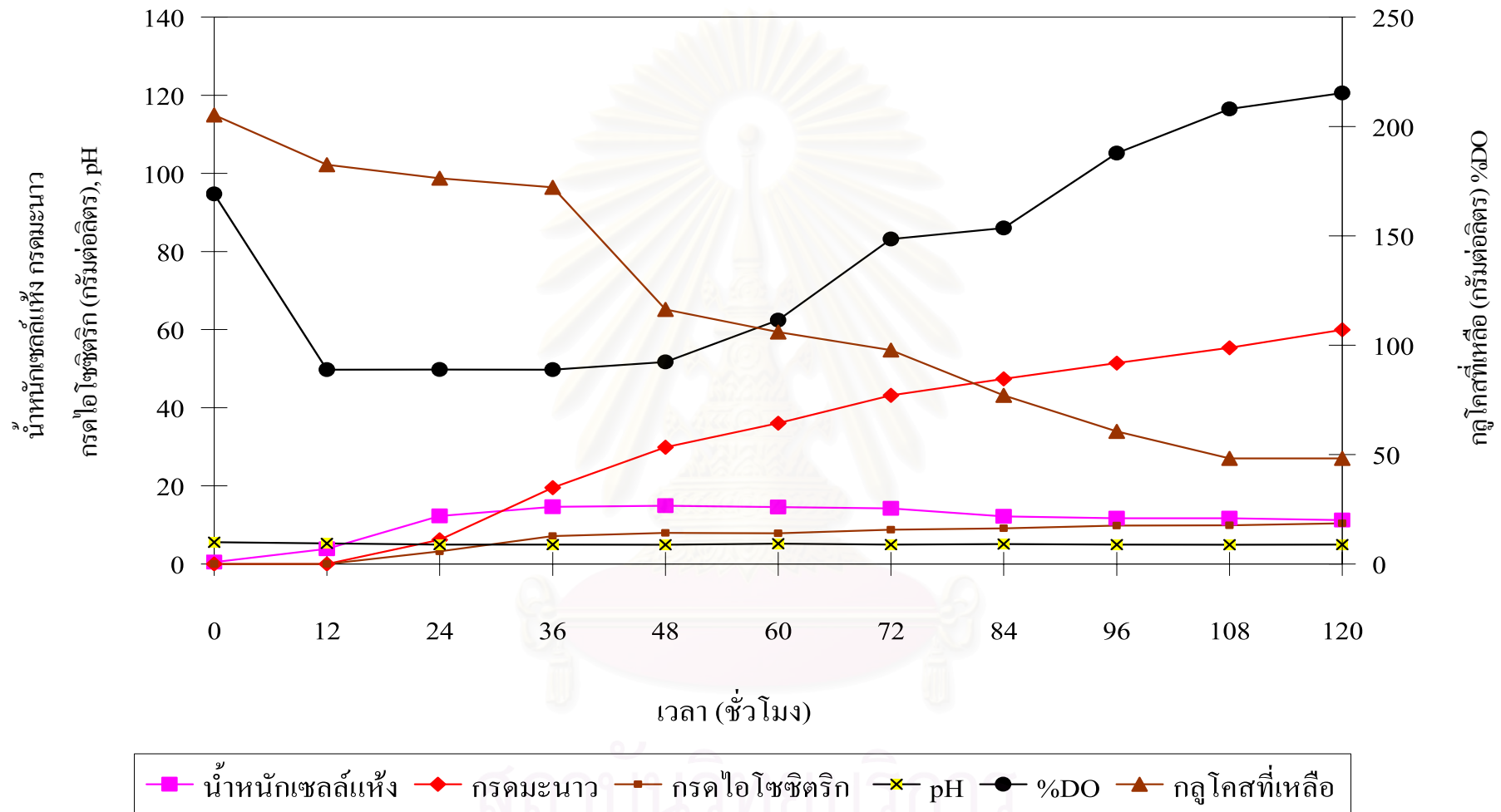
มะนาวเพิ่มขึ้นด้วยแต่ปริมาณกรดมะนาวที่ได้จากการแยกด้วยคอลัมน์แลกเปลี่ยนไอออนยังมีปริมาณน้อย ดังนั้นในการทดลองนี้ในส่วนของการหมักจะปรับค่าความเป็นกรดต่างด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่เตรียมไว้ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 จนถึงสิ้นสุดการทดลองร่วมกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ได้จากการแลกเปลี่ยนไอออน และคอลัมน์แลกเปลี่ยนไอออนบรรจุด้วยเรซิน 550 กรัม และรีเจนเนอเรทด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 40 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เริ่มคั่งน้ำหมักเข้าสู่ระบบแลกเปลี่ยนไอออนตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 แล้วเวียนน้ำหมักกลับเก็บตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมง วิเคราะห์ปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซชิตริกและกลูโคสที่เหลือ ให้ผลดังแสดงในตารางที่ จ.29 (ภาคผนวก จ) และรูปที่ 4.41 และ 4.42

เมื่อทำการควบคุมค่าความเป็นกรดต่างตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 จนถึงสิ้นสุดการทดลองพบว่าค่าความเป็นกรดต่างในถังหมักที่วัดได้มากกว่าค่าที่วัดได้จากการทดลองข้อ 4.11.1 และ 4.11.2 แต่มีน้ำหนักเซลล์แห้งน้อยกว่าการทดลองข้อ 4.11.2 อาจเนื่องจากการปรับค่าความเป็นกรดต่างด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ทั้งที่เตรียมไว้รวมทั้งที่บรรจุอยู่ในคอลัมน์แลกเปลี่ยนไอออนและที่ได้จากการแลกเปลี่ยนไอออนในคอลัมน์ ทำให้ปริมาณของโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้มากเกินไปทำให้ค่าความเป็นกรดต่างในถังหมักค่อนข้างสูงซึ่งมีผลต่อการเจริญของเซลล์

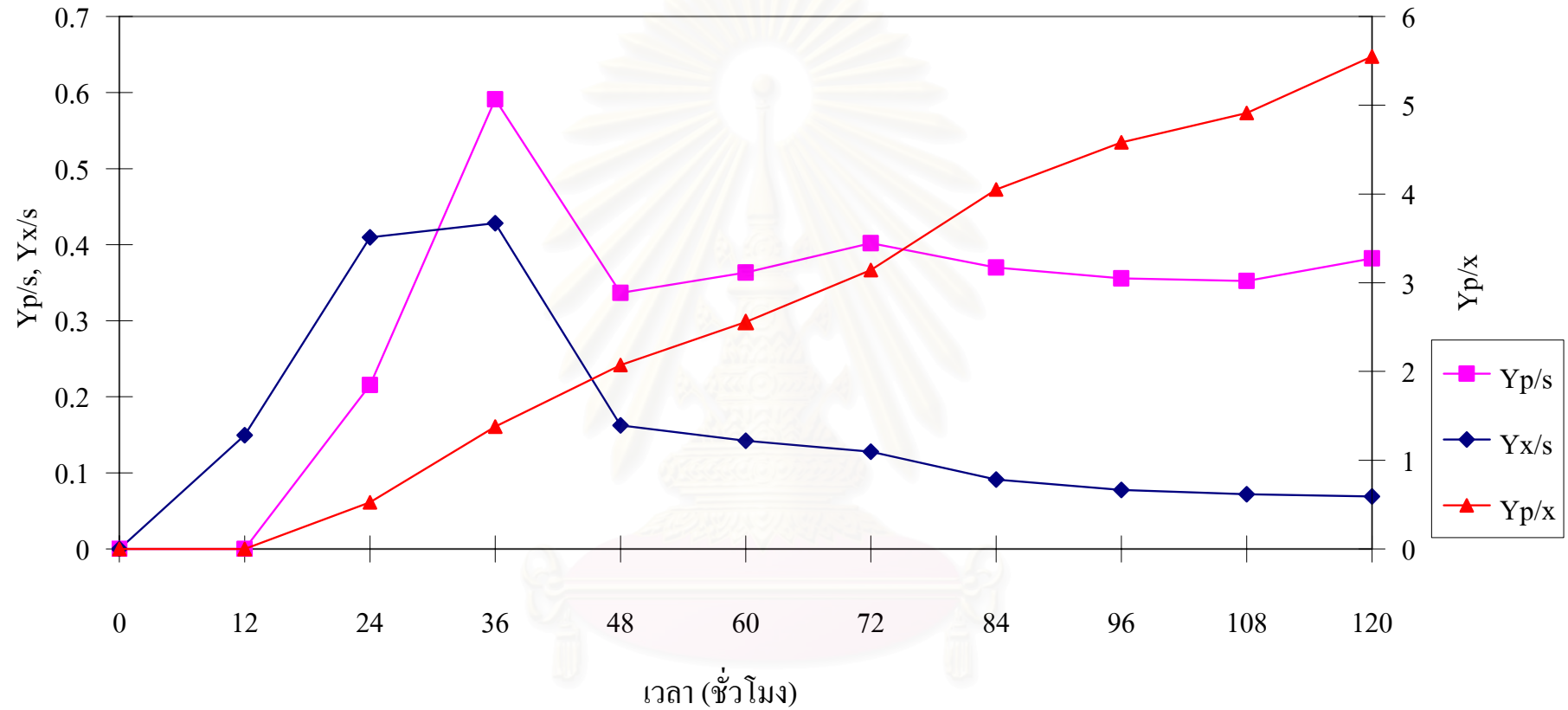
พิจารณาค่า $Y_{p/s}$ มีค่ามากกว่าผลการทดลองที่ 4.11.2 อาจเนื่องมาจากการควบคุมค่าความเป็นกรดต่างตลอดการทดลองซึ่งเป็นภาวะที่คล้ายกับการหมักยีสต์อิสระในถังหมักขนาด 2 ลิตรแต่ไม่ทำการแยกระหว่างหมัก ทำให้เชื้อเจริญได้ดีและมีเซลล์ปริมาณมากสามารถใส่กลูโคสเพื่อผลิตกรดมะนาวได้มากขึ้น และค่า $Y_{p/s}$ มีแนวโน้มที่เพิ่มขึ้นหลังจากสิ้นสุดการหมักชั่วโมงที่ 120 ซึ่งเป็นผลดีหากทำการหมักแบบต่อเนื่องซึ่งหากมีการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มจะทำให้ได้ผลผลิตเพิ่มขึ้นด้วย ค่า $Y_{p/x}$ มีค่าเพิ่มขึ้นตลอดการหมัก ซึ่งอธิบายได้ว่ามีเซลล์ปริมาณมากในถังหมักจึงทำให้สามารถผลิตกรดมะนาวได้มากด้วย ค่า $Y_{x/s}$ มีค่าเพิ่มขึ้นตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 และสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 36 จากนั้นค่าดังกล่าวจะลดลงจนถึงสิ้นสุดการหมักอาจเป็นเพราะหลังจากชั่วโมงที่ 24 เซลล์เจริญอยู่ในระยะเจริญแบบคงที่ และไม่เจริญเพิ่มขึ้นอีก ทำให้ค่า $Y_{x/s}$ หลังจากชั่วโมงที่ 36 มีค่าลดต่ำลง เมื่อสิ้นสุดการหมักได้ค่าอัตราการผลิตเท่ากับ 0.500 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ซึ่งมากกว่าในผลการทดลองที่ 4.11.1 และ 4.11.2

เมื่อสิ้นสุดการหมักนำคอลัมน์แลกเปลี่ยนไอออนมาชะด้วยสารละลายกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 1.5 โมลาร์ แบบ fast step เก็บสารละลายที่ถูกชะเป็นลำดับส่วน นำมาวิเคราะห์หาความเข้มข้นกรดมะนาวด้วยวิธี HPLC ให้ผลดังแสดงในตารางที่ จ.30 (ภาคผนวก จ) และรูปที่ 4.43 คำนวณหาปริมาณกรดมะนาวที่ชะได้ทั้งหมด

จากผลการทดลองพบว่าปริมาณกรดมะนาวที่ชะได้ทั้งหมดเท่ากับ 4.33 กรัมและปริมาตรสารละลายตัวชะที่ใช้เท่ากับ 1,000 มิลลิลิตร ซึ่งปริมาณกรดมะนาวที่ได้จากชะนี้เมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองข้อ 4.11.1 และ 4.11.2 พบว่ามีปริมาณที่น้อยกว่า ซึ่งเนื่องมาจากเรซินถูก



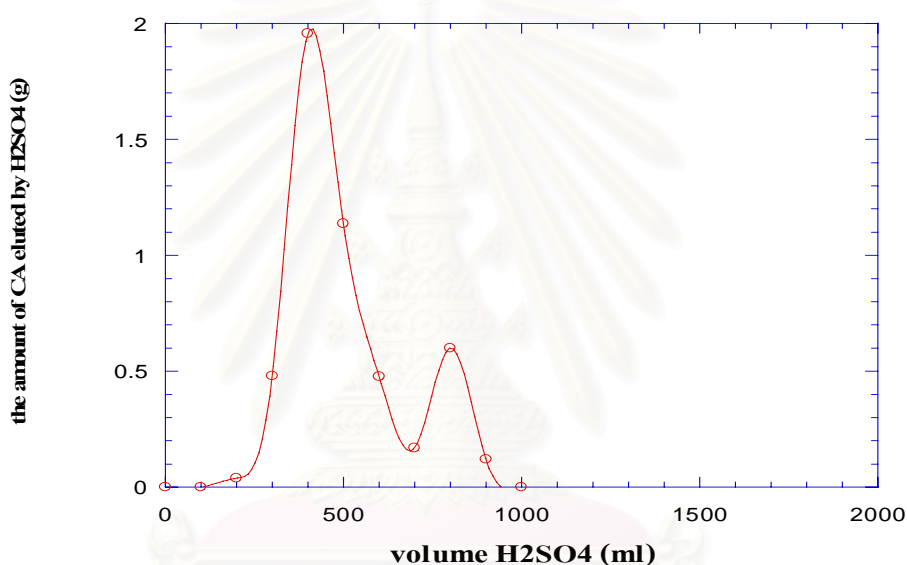
รูปที่ 4.41 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิทริก กลูโคสที่เหลือ ค่าความเป็นกรดต่าง และเปอร์เซ็นต์ออกซิเจนที่ละลายน้ำได้ ของการหมักที่เวลาต่างๆ เมื่อเลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* NNU-62 ในถังหมักขนาด 2 ลิตร รูปแบบการผลิตแบบ extractive fermentation ควบคุมค่าความเป็นกรดต่างตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 จนถึงสิ้นสุดการทดลอง



รูปที่ 4.42 ค่า $Y_{p/s}$, $Y_{x/s}$ และ $Y_{p/x}$ ที่ระยะเวลาต่างๆ ของการหมักเมื่อเลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* NNU-62 ในถังหมักขนาด 2 ลิตร รูปแบบการผลิตแบบ extractive fermentation ควบคุมค่าความเป็นกรดต่างตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 จนถึงสิ้นสุดการทดลอง

รีเจนเนอเรทด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 40 ทำให้เรซินเกิดการเสียสภาพและเมื่อนำไปทำการแยกกรดมะนาวจึงทำให้ประสิทธิภาพในการแยกกรดมะนาวลดลงด้วยเช่นกัน

ปริมาณกรดมะนาวที่ได้จากการหมักในถังหมักเท่ากับ 65.99 กรัม และปริมาณกรดมะนาวที่ได้จากการดูดซับด้วยคอลัมน์แลกเปลี่ยนไอออนเท่ากับ 4.33 กรัม ดังนั้นปริมาณกรดมะนาวทั้งหมดที่ได้จากกระบวนการหมักแบบ extractive fermentation โดยควบคุมค่าความเป็นกรดต่างตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 จนถึงสิ้นสุดการทดลองด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่เตรียมไว้ร่วมกับที่ได้จากการแยกด้วยคอลัมน์แลกเปลี่ยนไอออนเท่ากับ 70.32 กรัม ซึ่งปริมาณกรดมะนาวทั้งหมดที่ได้จากการทดลองนี้จะมีค่าใกล้เคียงกับผลการทดลองข้อ 4.11.2 (66.05 กรัม)



รูปที่ 4.43 ปริมาณกรดมะนาวที่ถูกชะด้วยสารละลายกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 1.5 โมลาร์ เมื่อทำการผลิตกรดมะนาวแบบ extractive fermentation ที่ควบคุมค่าความเป็นกรดต่างด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 40 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 จนถึงสิ้นสุดการทดลอง

4.11.4 ควบคุมค่าความเป็นกรดต่างด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 40 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 จนถึงสิ้นสุดการทดลอง และภายในคอลัมน์แลกเปลี่ยนไอออนลบบรรจุด้วยอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาว

จากผลการทดลองข้อ 4.11.1 ถึง 4.11.3 เมื่อทำการชะกรดมะนาวออกจากคอลัมน์ด้วยสารละลายกรดซัลฟูริกพบว่าปริมาณกรดมะนาวที่ชะออกมาได้มีปริมาณน้อยมาก และความเข้มข้นในถังหมักอยู่ในภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ ดังนั้นในการทดลองนี้ใน

ส่วนของการหมักจะปรับค่าความเป็นกรดต่างด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่เตรียมไว้ตั้งแต่ ชั่วโมงที่ 0 จนถึงสิ้นสุดการทดลองร่วมกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ได้จากการแลกเปลี่ยน ไอออน สำหรับคอลัมน์แลกเปลี่ยนไอออนเพื่อให้การแยกมีประสิทธิภาพเพิ่มมากขึ้นจึงเลือกใช้ คอลัมน์แลกเปลี่ยนไอออนจำนวน 2 คอลัมน์โดยแต่ละคอลัมน์จะบรรจุเรซิน 550 กรัมพร้อมกับ อาหารสำหรับผลิตภัณฑ์นม เริ่มคั่งน้ำหมักออกจากถังหมักตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 แล้วเวียนน้ำหมัก กลับเข้าสู่ถังหมัก เก็บตัวอย่างน้ำหมักทุกๆ 12 ชั่วโมง วิเคราะห์ปริมาณกรดนม กรดไอโซซีตริก และน้ำตาลกลูโคสที่เหลือ ให้ผลดังแสดงในตารางที่ จ.31 (ภาคผนวก จ) และรูปที่ 4.44 และ 4.45

เมื่อควบคุมค่าความเป็นกรดต่างตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 จนถึงสิ้นสุดการทดลอง พบว่าค่า ความเป็นกรดต่างในถังหมักที่วัดได้มีค่าประมาณ 4-5 น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 48 เท่ากับ 21.19 กรัมต่อลิตร เชื้อเริ่มมีการผลิตกรดนมตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 กรดนมที่ผลิตได้สูงสุดที่ ชั่วโมง 96 เท่ากับ 89.67 กรัมต่อลิตร

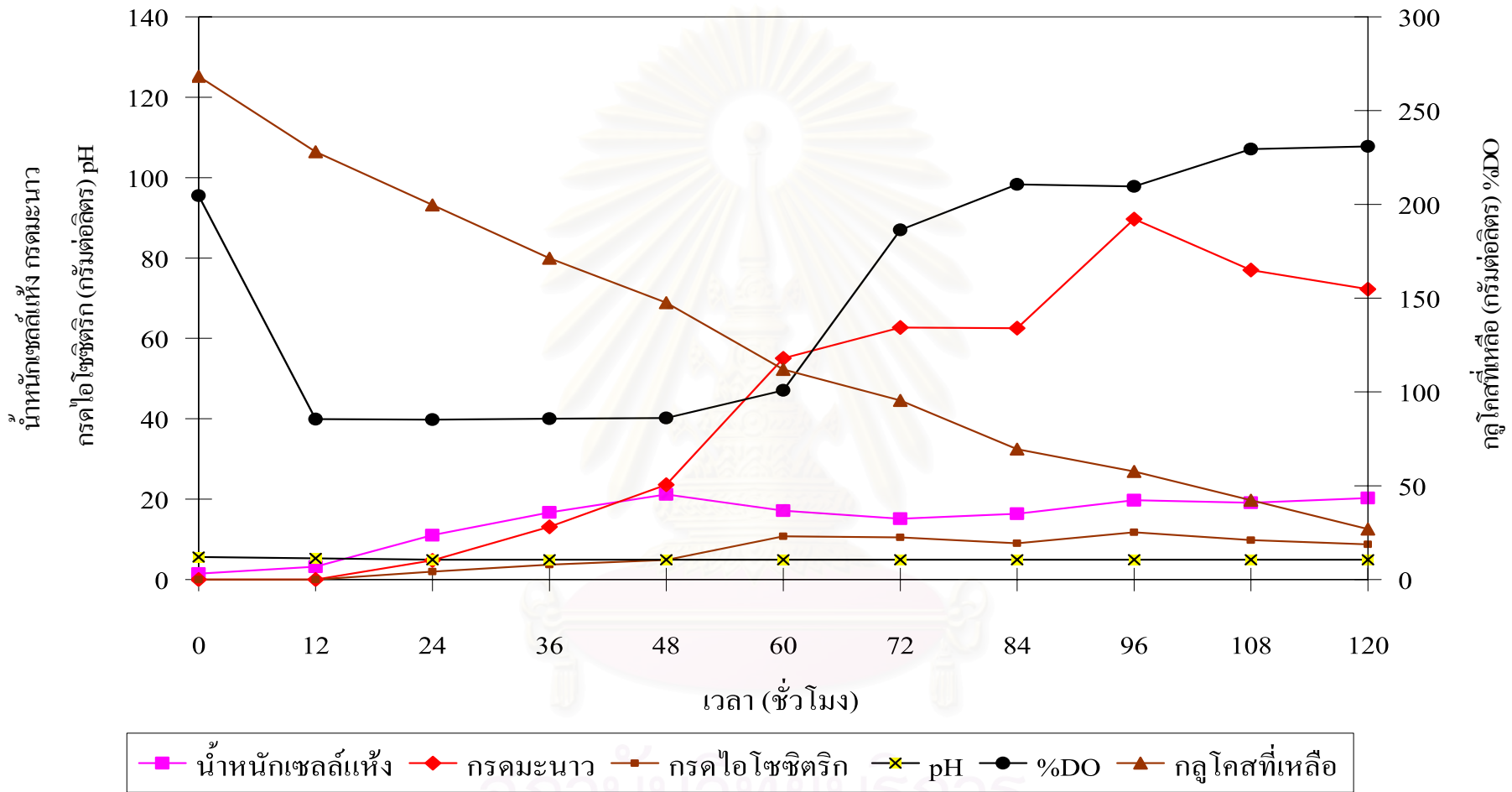
ทั้งค่า $Y_{p/s}$ และ $Y_{p/x}$ มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 สำหรับค่า $Y_{x/s}$ มีค่า เพิ่มขึ้นตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 และมีค่าสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 48 จากนั้นจะลดลงและคงที่ เมื่อสิ้นสุดการหมัก ได้อัตราการผลิตเท่ากับ 0.602 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

เมื่อสิ้นสุดการหมักนำคอลัมน์แลกเปลี่ยนไอออนมาชะด้วยสารละลายกรดซัลฟูริก ความเข้มข้น 1.5 โมลาร์ แบบ fast step เก็บสารละลายที่ถูกชะเป็นลำดับส่วน นำมาวิเคราะห์หา ความเข้มข้นกรดนมด้วยวิธี HPLC ให้ผลดังแสดงในตารางที่ จ.32 และ จ.33 (ภาคผนวก จ) และ รูปที่ 4.46

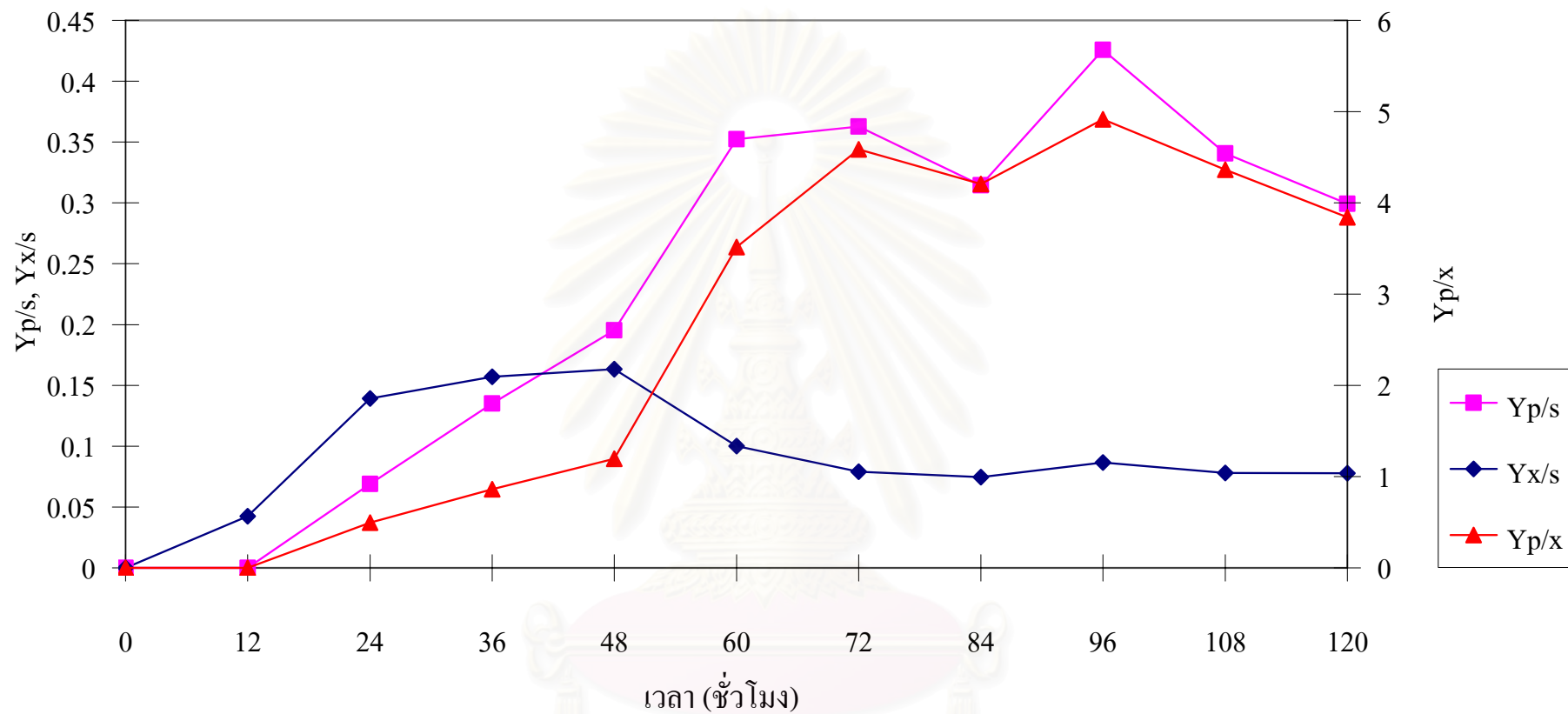
จากผลการทดลองพบว่าสารละลายกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 1.5 โมลาร์สามารถ ชะกรดนมออกจากคอลัมน์ที่ 1 เท่ากับ 8.50 กรัม ปริมาตรสารละลายตัวชะที่ใช้ 1,100 มิลลิลิตร และคอลัมน์ที่ 2 เท่ากับ 2.52 กรัม ปริมาตรละลายตัวชะที่ใช้เท่ากับ 1,100 มิลลิลิตร

ปริมาณกรดนมที่ได้จากการหมักในถังหมักเท่ากับ 79.48 กรัม และปริมาณ กรดนมที่ได้จากการดูดซับด้วยคอลัมน์แลกเปลี่ยนไอออนทั้ง 2 คอลัมน์เท่ากับ 11.12 กรัม ดังนั้นปริมาณกรดนมทั้งหมดที่ได้จากกระบวนการหมักแบบ extractive fermentation โดย ควบคุมค่าความเป็นกรดต่างตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 จนถึงสิ้นสุดการทดลองด้วยสารละลายโซเดียม ไฮดรอกไซด์ ที่เตรียมไว้ร่วมกับที่ได้จากการแยกด้วยคอลัมน์แลกเปลี่ยนไอออนเท่ากับ 90.50 กรัม

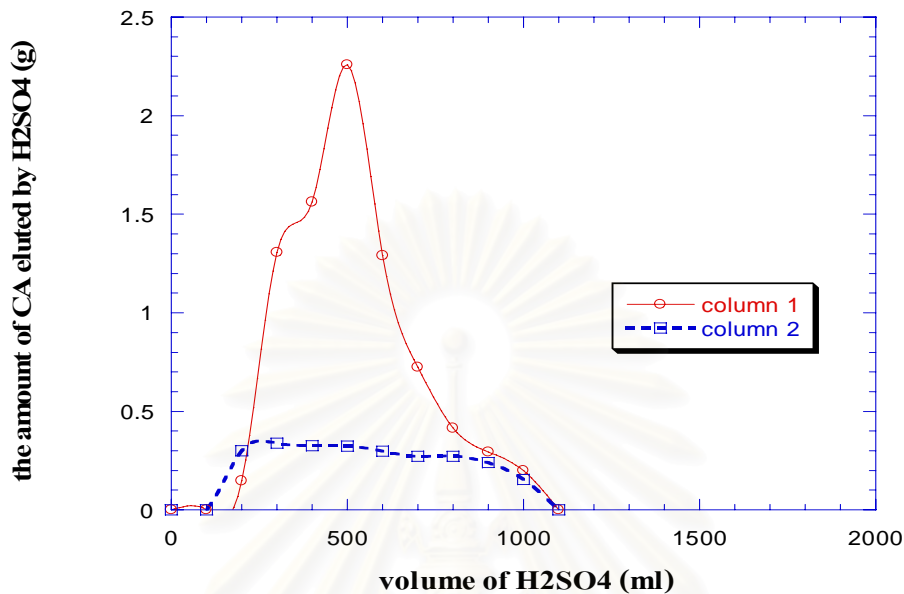
เมื่อเปรียบเทียบปริมาณกรดนมที่ผลิตได้ในผลการทดลองนี้กับผลการทดลอง ข้อ 4.11.1 ถึง 4.11.3 พบว่าเมื่อทำการปรับค่าความเป็นกรดต่างตั้งแต่เริ่มต้นจึงทำให้ภาวะในถัง หมักเหมาะสำหรับการเจริญของเซลล์และเซลล์สามารถผลิตกรดนมได้เพิ่มขึ้น ทำให้ได้ปริมาณ กรดนมเพิ่มขึ้นและปริมาณกรดนมในถังหมักเท่ากับ 79.48 กรัม และเมื่อเริ่มคั่งน้ำหมักเข้า คอลัมน์แลกเปลี่ยนไอออนที่ภายในคอลัมน์บรรจุด้วยอาหารสำหรับผลิตภัณฑ์นมแล้วเวียนน้ำ



รูปที่ 4.44 น้ำหนักรวมของแข็ง ปริมาณกรดอะมิโนรวม กรดไอโซซิทริก กลูโคสที่เหลือ ค่าความเป็นกรดต่าง และเปอร์เซ็นต์ออกซิเจนที่ละลายน้ำได้ ของการหมักที่เวลาต่างๆ เมื่อเลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* NNU-62 ในถังหมักขนาด 2 ลิตร รูปแบบการผลิตแบบ extractive fermentation ควบคุมค่าความเป็นกรดต่างตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 จนถึงสิ้นสุดการทดลอง แยกด้วยคอลัมน์แลกเปลี่ยนไอออน 2 คอลัมน์



รูปที่ 4.45 ค่า $Y_{p/s}$, $Y_{x/s}$ และ $Y_{p/x}$ ที่ระยะเวลาต่างๆ ของการหมักเมื่อเลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* NNU-62 ในถังหมักขนาด 2 ลิตร รูปแบบการผลิตแบบ extractive fermentation ควบคุมค่าความเป็นกรดต่างตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 จนถึงสิ้นสุดการทดลอง แยกด้วยคอลัมน์แลกเปลี่ยนไอออน 2 คอลัมน์



รูปที่ 4.46 ปริมาณกรดมะนาวที่ถูกชะด้วยสารละลายกรดซัลฟริกความเข้มข้น 1.5 โมลาร์ เมื่อทำการผลิตกรดมะนาวแบบ extractive fermentation ที่ควบคุมค่าความเป็นกรดต่างด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 40 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 จนถึงสุดท้ายทดลอง และทำการแยกกรดมะนาวด้วยคอลัมน์ 2 คอลัมน์

หมักกลับเข้าสู่ถังหมัก รูปแบบการหมักจะเป็นแบบต่อเนื่องทำให้เซลล์ได้รับสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญและพบว่าน้ำหนักเซลล์แห้งในถังหมักมีปริมาณเพิ่มขึ้นเท่ากับ 21.19 กรัมต่อลิตร แต่เมื่อนำคอลัมน์มาชะด้วยสารละลายกรดซัลฟริกพบว่าปริมาณกรดมะนาวยังมีน้อยถึงแม้ว่าจะใช้คอลัมน์แลกเปลี่ยนไอออนถึง 2 คอลัมน์แล้วก็ตาม ซึ่งจะต้องปรับปรุงวิธีการแยกกรดมะนาวด้วยคอลัมน์แลกเปลี่ยนไอออนหรืออาจต้องนำวิธีการอื่นๆ มาใช้ร่วมกับการแยกด้วยคอลัมน์แลกเปลี่ยนไอออน เช่น กระบวนการอิเล็กโทรไดอะลิซิส จากงานวิจัยของเรณินทร์ (2547) ได้ศึกษาผลของตัวแปรที่มีต่อการแยกกรดมะนาวด้วยกระบวนการอิเล็กโทรไดอะลิซิสและหาภาวะที่เหมาะสมเพื่อเป็นแนวทางในกานนำกระบวนการดังกล่าวมาใช้ควบคู่การหมักเพื่อเพิ่มผลผลิต พบว่ามีความเป็นไปได้ที่จะนำเอากระบวนการอิเล็กโทรไดอะลิซิสมาร่วมกับการหมักเพื่อช่วยเพิ่มผลผลิต โดยที่อัตราการการแยกและอัตราการผลิตควรจะมีค่าใกล้เคียงกันจึงจะทำให้สามารถช่วยลดปัญหา osmolarity ที่สูงเนื่องจากการรักษาค่าความเป็นกรดต่างในถังหมักด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์

ในทางปฏิบัติหากต้องการที่จะนำกระบวนการแยกโดยอิเล็กโทรไดอะลิซิสมาร่วมกับคอลัมน์แลกเปลี่ยนไอออนเพื่อแยกกรดมะนาว น้ำหมักจะถูกดึงออกจากน้ำหมักแล้วนำไป

แยกด้วยกระบวนการอิเล็กโทรไลต์ก่อนเพื่อแยกโซเดียมไอออนออกจากซีเตรทไอออน รวมทั้งแยกไฮดรอกไซด์ไอออนด้วย จากนั้นจึงเวียนสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ได้จากกระบวนการนี้กลับเข้าถังหมักเพื่อควบคุมค่าความเป็นกรด่างภายในถังหมักร่วมกับโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่เตรียมไว้ สำหรับซีเตรทไอออนที่แยกได้นำมาผ่านคอลัมน์แลกเปลี่ยนไอออนลบ และทำการชะด้วยสารละลายกรดซัลฟูริกเพื่อให้ได้กรดมะนาวที่บริสุทธิ์ต่อไป

4.11.5 เปรียบเทียบการผลิตกรดมะนาวด้วยยีสต์ *C. oleophila* NNU-62 ด้วยการหมักแบบไม่แยกระหว่างหมักและแบบ extractive fermentation ในถังหมักขนาด 2 ลิตร

พิจารณาผลผลิตกรดมะนาวและค่าจลนพลศาสตร์จากการหมักแบบไม่แยกระหว่างหมักกับแบบ extractive fermentation ในถังหมักขนาด 2 ลิตร ดังแสดงในตารางที่ 4.2 พบว่า เมื่อสิ้นสุดการหมักที่ 120 ชั่วโมง ความเข้มข้นกรดมะนาวในถังหมักจากการผลิตแบบ extractive fermentation ในผลการทดลองข้อ 4.11.4 มีค่าสูงสุดเท่ากับ 89.67 กรัมต่อลิตร (คิดเป็นปริมาณกรดมะนาวในถังหมักเท่ากับ 79.48 กรัม) และเมื่อเปรียบเทียบกับการผลิตแบบไม่แยกระหว่างหมักซึ่งให้ความเข้มข้นกรดมะนาวในถังหมักเท่ากับ 73.79 กรัมต่อลิตรพบว่าให้ความเข้มข้นกรดมะนาวที่ใกล้เคียงกัน สำหรับอัตราการผลิตกรดมะนาวสูงสุด พบว่า การผลิตแบบ extractive fermentation ในผลการทดลองข้อ 4.11.4 มีค่าสูงสุดเท่ากับ 0.602 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และให้ค่าใกล้เคียงกับการผลิตแบบไม่แยกระหว่างหมัก (0.615 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)

เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาวทั้งหมดที่ได้จากการทดลอง พบว่าการผลิตแบบ extractive fermentation ตามผลการทดลองข้อ 4.11.4 มีค่าสูงสุดเท่ากับ 90.50 กรัมซึ่งให้ค่ามากกว่าการผลิตแบบไม่แยกระหว่างหมัก (81.17 กรัม) ซึ่งจากปริมาณกรดมะนาวทั้งหมดที่ได้จากการทดลองกล่าวได้ว่ามีความเป็นไปได้ที่จะนำเอากระบวนการหมักแบบ extractive fermentation มาใช้ในการผลิตกรดมะนาวเพื่อเพิ่มผลผลิตกรดมะนาว โดยต้องศึกษาเพิ่มเติมในส่วนของ การแยกกรดมะนาวด้วยคอลัมน์แลกเปลี่ยนไอออนเพื่อให้การแยกมีความสัมพันธ์กับผลิตกรดมะนาว และสามารถลดปัญหา osmolality ที่เกิดจากการควบคุมค่าความเป็นกรด่างด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ได้ หรืออาจพัฒนากระบวนการแยกโดยนำเอาเทคนิคอื่นๆ มาใช้ร่วมด้วย เช่น การนำเทคนิคอิเล็กโทรไลต์มาช่วยแยกกรดมะนาวออกจากสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เพื่อให้การแยกกรดมะนาวมีประสิทธิภาพมากขึ้นและได้กรดมะนาวที่บริสุทธิ์เพิ่มขึ้น อีกทั้งสามารถทำการหมักแบบต่อเนื่องโดยที่เซลล์ยังคงมีความสามารถในการผลิตกรดมะนาวซึ่งจะทำให้ได้ผลผลิตกรดมะนาวเพิ่มขึ้นอีกด้วย

ตารางที่ 4.2 เปรียบเทียบค่าจลนพลศาสตร์ของการหมักยีสต์ *C. oleophila* NNU-62 เพื่อผลิตกรดมะนาวแบบไม่แยกระหว่างหมักและแบบ extractive fermentation

ค่าจากการทดลอง	กระบวนการหมักแบบ				
	ไม่แยก ระหว่างหมัก	ผลการทดลองข้อ 4.11.1	ผลการทดลองข้อ 4.11.2	ผลการทดลองข้อ 4.11.3	ผลการทดลองข้อ 4.11.4
น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	14.08	10.14	13.28	11.26	20.28
ความเข้มข้นกรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	73.79	15.34	47.63	59.99	72.25
ระยะเวลาที่ใช้ในการหมัก (ชั่วโมง)	120	120	120	120	120
ผลผลิตเซลล์ต่อน้ำตาลที่ใช้ ($Y_{x/s}$)	0.069	0.060	0.068	0.069	0.078
ผลผลิตกรดมะนาวต่อน้ำตาลที่ใช้ ($Y_{p/s}$)	0.406	0.108	0.268	0.382	0.299
ผลผลิตกรดมะนาวต่อเซลล์ ($Y_{p/x}$)	5.842	1.786	3.953	5.549	3.843
อัตราการผลิตกรดมะนาว (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)	0.615	0.128	0.397	0.500	0.602
ปริมาณกรดมะนาวในถังหมัก(กรัม)	81.17	16.26	57.16	65.99	79.48
ปริมาณกรดมะนาวที่ได้จากคอลัมน์ แลกเปลี่ยนไอออนที่ 1 (กรัม)	-	12.87	8.89	4.33	8.50
ปริมาณกรดมะนาวที่ได้จากคอลัมน์ แลกเปลี่ยนไอออนที่ 2 (กรัม)	-	-	-	-	2.52
ปริมาณกรดมะนาวทั้งหมด (กรัม)	81.17	29.13	66.05	70.32	90.50

หมายเหตุ เครื่องหมาย (-) หมายถึง ไม่ได้ทำการทดลอง

ผลการทดลองที่ 4.11.1 ควบคุมค่าความเป็นกรดต่างตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24, รีเจนเนอเรชันด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 2 โมลาร์และล้างตามด้วยน้ำกลั่น

ผลการทดลองที่ 4.11.2 ควบคุมค่าความเป็นกรดต่างทุกๆ 12 ชั่วโมง, รีเจนเนอเรชันด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 2 โมลาร์

ผลการทดลองที่ 4.11.3 ควบคุมค่าความเป็นกรดต่างตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 จนถึงสิ้นสุดการทดลอง, รีเจนเนอเรชันด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 40

ผลการทดลองที่ 4.11.4 ควบคุมค่าความเป็นกรดต่างตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 จนถึงสิ้นสุดการทดลอง, รีเจนเนอเรชันด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 2 โมลาร์และภายในคอลัมน์บรรจุด้วยอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาว

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

5.1 การผลิตกรดมะนาวด้วยเชื้อ *C. oleophila* NNU-62 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร พบว่าเชื้อสามารถผลิตกรดมะนาวได้ความเข้มข้นกรดมะนาวเท่ากับ 76.61 กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณกรดมะนาวเท่ากับ 168.54 กรัม และได้อัตราการผลิตกรดมะนาวเท่ากับ 0.638 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

5.2 การผลิตกรดมะนาวด้วยเซลล์ตรึง *C. oleophila* NNU-62 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่อัตราการกวน 50 รอบต่อนาทีและไม่กวนผสม (อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที) และในถังหมักแบบฟลูอิดไดซ์เบด (อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที) พบว่าเซลล์ตรึงผลิตกรดมะนาวได้ความเข้มข้นสูงสุดเท่ากับ 0.73, 3.47 และ 2.65 กรัมต่อลิตรตามลำดับ และอัตราการผลิตกรดมะนาวเท่ากับ 0.006, 0.029 และ 0.022 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงตามลำดับ ทั้งความเข้มข้นกรดมะนาวและอัตราการผลิตจากการผลิตด้วยเซลล์ตรึงมีค่าน้อยกว่าการผลิตด้วยยีสต์อิสระในถังหมักขนาด 5 ลิตร ซึ่งให้ค่าเท่ากับ 76.61 กรัมต่อลิตรและ 0.638 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ

5.3 การผลิตกรดมะนาวด้วยเชื้อ *C.oleophila* NNU-62 ในถังหมักขนาด 2 ลิตร พบว่าเชื้อสามารถผลิตกรดมะนาวได้ความเข้มข้นกรดมะนาวเท่ากับ 73.79 กรัมต่อลิตร และอัตราการผลิตกรดมะนาวเท่ากับ 0.602 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับการผลิตด้วยยีสต์อิสระในถังหมักขนาด 5 ลิตร (อัตราการผลิตเท่ากับ 0.638 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)

5.4 เปรียบเทียบการดูดซับกรดมะนาวสูงสุดที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 5.00 ของเรซิน 3 ชนิด ได้แก่ เรซินแลกเปลี่ยนไอออนลบชนิดแรง (Dowex 1x4-400), เรซินแลกเปลี่ยนไอออนลบชนิดอ่อน (Dowex Marathon WBA) และเรซินแบบไม่มีประจุ (Amberlite XAD-7) พบว่าเรซิน Dowex Marathon WBA สามารถดูดซับกรดมะนาวได้สูงสุดเท่ากับ 0.33 กรัมกรดมะนาวต่อกรัมเรซิน ที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 5.00

5.5 รูปแบบ ion exchange isotherm ของการดูดซับกรดมะนาวในสารละลายกรดมะนาวเกรดทางการค้าและอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 5.00 ด้วย

เรซิน Dowex Marathon WBA มีลักษณะแบบ Langmuir ค่าความสามารถในการดูดซับกรดมะนาวสูงสุด (q_m) เท่ากับ 0.74 และ 0.38 กรัมกรดมะนาวต่อกรัมเรซินตามลำดับ และค่าคงที่ของการดูดซับ (K) เท่ากับ 65.84 และ 31.42 กรัมต่อลิตรตามลำดับ

5.6 ภาวะที่เหมาะสมในการดูดซับกรดมะนาวด้วยคอลัมน์แลกเปลี่ยนไอออน จาก breakthrough curve พบว่าที่อัตราการไหลเท่ากับ 7.50 มิลลิลิตรต่อชั่วโมงต่อมิลลิลิตรของปริมาตรว่างระหว่างเรซินมีความเหมาะสมในการดูดซับกรดมะนาว โดยสามารถดูดซับกรดมะนาวในสารละลายกรดมะนาวเกรดทางการค้าที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 5.00 และในน้ำหมักกรดมะนาวที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 5.30 ได้ปริมาณสูงสุดเท่ากับ 0.86 และ 0.56 กรัมกรดมะนาวตามลำดับ

5.7 ภาวะที่เหมาะสมในการชะกรดมะนาวด้วยสารละลายกรดซัลฟูริก พบว่าความเข้มข้นกรดซัลฟูริกเท่ากับ 1.0 โมลาร์สามารถชะกรดมะนาวในสารละลายกรดมะนาวเกรดทางการค้าที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 5.00 ออกจากเรซินได้เปอร์เซ็นต์การชะมากที่สุดเท่ากับ 61.34 เปอร์เซ็นต์ และความเข้มข้นกรดซัลฟูริกเท่ากับ 1.5 โมลาร์สามารถชะกรดมะนาว ออกจากเรซินได้เปอร์เซ็นต์การชะมากที่สุดเท่ากับ 41.02 เปอร์เซ็นต์ และอัตราการไหลของกรดซัลฟูริกที่เหมาะสมคือ อัตราการไหลเท่ากับ 7.50 มิลลิลิตรต่อชั่วโมงต่อมิลลิลิตรของปริมาตรว่างระหว่างเรซิน

5.8 พัฒนาระบวนการผลิตกรดมานาวโดยผลิตกรดมะนาวด้วยยีสต์อิสระในถังหมักขนาด 2 รูปแบบการหมัก extractive fermentation พบว่าส่วนของการหมักต้องควบคุมค่าความเป็นกรดต่างด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 40 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 จนถึงสิ้นสุดการทดลองเพื่อให้ภาวะในถังหมักมีความเหมาะสมต่อการเจริญของเซลล์ และส่วนของการแยกด้วยคอลัมน์แลกเปลี่ยนไอออนใช้ 2 คอลัมน์โดยภายในบรรจุด้วยอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวทำให้ได้ปริมาณกรดมะนาวทั้งหมดสูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับกรการผลิตกรดมะนาวด้วยยีสต์อิสระแบบไม่แยกระหว่างหมัก ซึ่งมีความเป็นไปได้ที่จะนำวิธีการดังกล่าวไปใช้ในการผลิตกรดมะนาวในระดับขยายส่วนต่อไป

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

- ภรณ์ ลิ้มปีสุต. 2538. การตรึงเซลล์ *Candida oleophila* C-73 เพื่อผลิตกรดมะนาว. วิทยานิพนธ์
ปริญญาโท สาขาวิชาจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- เรณินทร์ สุขสุขะโน. 2547. อิเล็กโทรไลต์เพื่อการแยกกรดมะนาวจากน้ำหมัก. วิทยานิพนธ์
ปริญญาโท สาขาวิชาจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- สาโรจน์ ศิริสันสนียกุล, วรสิทธิ์ โทจำปา และ ประวิทย์ วงศ์คงคาเทพ. 2544. วิศวกรรมเคมีชีวภาพ
พื้นฐาน 2. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ภาษาอังกฤษ

- Abou-Zeid, A.A. and Ashy, M.A. 1984. Production of citric acid: A review. Agricultural wastes
9: 51-76
- Alteriis, E., Silvestro, G., Poletto, M., Romano, V., Capitanio, D., Compagno, C. and
Parascandola, P. 2004. *Kluyveromyces lactis* cells entrapped in Ca-alginate beads for the
continuous production of a heterologous glucoamylase. Journal of Biotechnology 109:
83-92
- Annadurai, R. 1989. Fouling of ion selective membranes during electrodialysis of grape must.
Desalination 41: 115-126
- Bailly, M., Balmann, H.R., Aimer, P., Lutin, F. and Cheryan, M. 2001. Production processes of
fermented organic acids targeted around membrane operations: design of the
concentration step by conventional electrodialysis. Journal of Membrane Science 191:
129-142
- Beniel, A.M. 1982. Extraction of organic acids from aqueous solutions. US patent n. 4,334,095
June, 8, 1982
- Bernfeld, P. 1955. Amylases, α and β In Colowick, S.P. and Kaplan, N.O. (eds.), Method in
Enzymology vol.3. New York : Academic Press.
- Bódalo, A., Gómez, J. L., Bastida, J. and Máximo, M. F. 1995. Fluidized bed reactors operating
with immobilized enzyme systems: Design model and its experimental verification.
Enzyme and Microbial Technology 17: 915-922
- Bouchard, E.F. and Merritt, E.F. 1979. Citric acid. In: Kirk-Other Encyclopedia of Chemical
Technology vol.6. New York: John Wiley & Sons.

- Cao, X., Yun, H.S. and Koo, Y.M. 2002. Recovery of L-(+)-lactic acid by anion exchange resin Amberlite IRA-400. Biochemical Engineering Journal 11: 189-196
- Cheetham, P.S.J., Blunt, K.W. and Bucke, C. 1980. Topics in enzyme and fermentation Biotechnology vol4. New York: Academic Press.
- Chibata, I. 1978. Immobilized enzymes, research and development. Tokyo: Kodansha Ltd.
- Crolla, A. and Kennedy, K.J. 2004. Fed-batch production of citric acid by *Candida lipolytica* grown on n-paraffins. Journal of Biotechnology 110: 73-84
- Enzminger, J.D. and Asenjo, J.A. 1986. Use of cell recycle in the aerobic fermentative production of citric acid by yeast. Biotechnology letters 8: 7-12
- Feng, Q., Mi, L., Li, L., Liu, R., Xie, L., Tang, H. and Chen, Z. 2005. Application of "oxygen uptake rate-amino acids" associated mode in controlled-fed perfusion culture. Journal of Biotechnology *In press*
- Fired, J.H. 1972. Method of producing citric acid by fermentation. US patent 3,632,476.
- Furukawa, T., Matsuyoshi, T., Minoda, Y. and Yamada, K. 1977. Fermentative production of citric acid from *n*-paraffins by yeast. Journal of Fermentation Technology 55: 356-363
- Gautam, G.B. and Carole, A.H. 1995. Hybridoma growth and antibody production as a function of cell density and specific growth rate in perfusion culture. Biotechnology and Bioengineering 48: 289-300
- Geankoplis, C.J. 1993. Transport processes and unit operations 3rd ed. New Jersey: Prentice Hall.
- Hamissa, F.A. and Abou-Zeid, A. 1981. Fermentative production of citric acid by yeasts. Agricultural wastes 3: 21-33
- Hilfferich, F. 1962. Ion exchange New York: McGraw-Hill.
- Honecker, S., Bisping, B., Yang, Z. and Rehm, H.J. 1989. Influence of sucrose concentration and phosphate limitation on citric acid production by immobilized cells of *Aspergillus niger*. Applied Microbiology and Biotechnology 31: 17-24
- Horitsu, H., Adachai, S., Takahashi, Y., Kawai, K. and Kawano, Y. 1985. Production of citric acid by *Aspergillus niger* immobilized in polyacrylamide gels. Applied Microbiology and Biotechnology 22: 8-12
- Jianlong, W., Xianghua, W. and Ding, Z. 2000. Production of citric acid from molasses integrated with in-situ product separation by ion-exchange resin adsorption. Bioresource Technology 75: 231-234

- Kautola, H., Rymowicz, W., Linko, Y. and Linko, P. 1991. Production of citric acid with immobilized *Yarrowia lipolytica*. Applied Microbiology and biotechnology 35: 447-449
- Kapoor, K.K., Chaudhary, K. and Tauro, P. 1983. Citric acid. Prescott and Dunn's Industrial Microbiology 4th ed. Westport: AVI Publishing.
- Kim, C.H., Kim, S.W. and Hong, S.I. 1999. An integrated fermentation-separation process for the production of red pigment by *Serratia* sp. KH-95. Process biochemistry 35: 485-490
- Klasson, T.K., Clausen, E.C. and Gaddy, J.L. 1989. Continuous fermentation for the production of citric acid from glucose. Applied Biochemistry and Biotechnology 20/21: 491-509
- Koshcheenko, K.A. 1981. Living immobilized cells as biocatalysts of transformation and biosynthesis of organic acid compounds. Applied Microbiology and Biotechnology 17: 351-365
- Kubicek, C.P. and Rohr, M. 1986. Citric acid fermentation. Critical Reviews In Biotechnology 3: 331-373
- Maddox, I.S. and Kingston, P.J. 1983. Use of immobilized cells of the yeasts, *Saccharomycopsis lipolytica*, for the production of citric acid. Biotechnology letters 5: 795-798.
- Marison, W. 1988. Citric acid production. In Scragg, A.H. Biotechnology for Engineer: Biological Systems in Technological Process New York: John Wiley & Sons.
- Mattey, M. 1992. The production of organic acid. Critical Reviews In Biotechnology 12(1/2): 87-132
- Milsom, P.E. and Meers, J.L. 1985. Citric acid. In M.Moo Young (ed). Comprehensive Biotechnology vol3. London: Pergaman Press.
- Moresi, M., Cimarelli, D., Gasparrini, G., Liuzzo, G. and Marinelli, R. 1980. Kinetics of citric acid fermentation from *n*-paraffins by yeasts. Journal of Chemical Technology and Biotechnology 30: 266-277
- Najafpour, G., Younesi, H. and Iamail, K.S.K. 2004. Ethanol fermentation in an immobilized cell reactor using *Saccharomyces cerevisiae*. Bioresource Technology 92: 251-260
- Pazouki, M. and Panda, T. 1998. Recovery of citric acid-a review. Bioprocess Engineering 19: 435-439
- Pitt, W.W., Haag, G.L. and Lee, D.D. 1983. Recovery of ethanol from fermentation broths using selective sorption-desorption. Biotechnology and Bioengineering 25: 123-131
- Rane, K.D. and Simst, K.A. 1995. Citric acid production by *Candida lipolytica* Y 1095 in cell recycle and fed-batch fermentors. Biotechnology and Bioengineering 46: 325-332

- Rymowicz, W., Kautola, H., Wojtatowicz, M., Linko, Y.Y. and Linko, P. 1993. Studies on citric acid production with immobilized *Yarrowia lipolytica* in repeated batch and continuous air-lift bioreactors. Applied Microbiology and Biotechnology 39: 1-4
- Santos, J.C., Converti, A., Carvalho, W., Mussatto, S.I and Silva, S.S. 2005. Influence of aeration rate and carrier concentration on xylitol production from sugarcane bagasse hydrolyzate in immobilized-cell fluidized bed reactor. Process Biochemistry 40: 113-118
- Sarmidi, M.R., Ling, L. and Leow, H. 2002. Citric acid concentration by electrodialysis: ion and water transport modeling. Journal of Membrane Science 199: 59-67
- Silva, S.S., Santos, J.C., Carvalho, W., Aracava, K.K. and Vitolo, M. 2003. Use of a fluidized bed reactor operated in semi-continuous mode for xylose-to-xylitol conversion by *Candida guilliermondii* immobilized on porous glass. Process Biochemistry 38: 903-907
- Tisnadjaja, D., Gutierrez, N.A. and Maddox, I.S. 1996. Citric acid production in a bubble-column reactor using cells of the yeast *Candida guilliermondii* immobilized by adsorption onto sawdust. Enzyme and Microbial Technology 19: 343-347
- Tong, W.Y., Fu, X.Y., Lee, S.M., Yu, J., Liu, J.W., Wei, D.Z. and Koo, Y.M. 2004. Purification of L(+)-lactic acid from fermentation broth with paper sludge as a cellulosic feedstock using weak anion exchanger Amberlite IRA-92. Biochemical Engineering Journal 18: 89-96
- Venter, T., Kock, J.L.F., Botes, P.J., Smit, M.S., Hugo, A. and Joseph, M. 2004. Acetate enhances citric acid production by *Yarrowia lipolytica* when grown on sunflower oil. Systematic and applied microbiology 27: 135-138
- Widiasa, I.N., Sutrisna, P.D. and Wenten, I.G. 2004. Performance of a novel electrodeionization technique during citric acid recovery. Separation and Purification Technology 39: 89-97
- Wojtatowicz, M., Rymowicz, W. and Kautola, H. 1991. Comparison of different strains of the yeast *Yarrowia lipolytica* for citric acid production from glucose hydroly. Applied Biochemistry and Biotechnology 31: 165-174
- Xuenmei, L., Jianping, L., Mo'e, L. and Peilin, C. 1999. L-lactic acid production using immobilized *Rhizopus oryzae* in a three-phase fluidized-bed with simultaneous product separation by electrodialysis. Bioprocess Engineering 20: 231-237
- Ye, K., Jin, S. and Shimizu, K. 1996. Performance improvement of lactic acid fermentation by multistage extractive fermentation. Journal of Fermentation and Bioengineering 3: 240-246

Zihao, W. and Kefeng, Z. 1995. Kinetics and mass transfer for lactic acid recovered with anion exchange method in fermentation solution. Biotechnology and Bioengineering 47: 1-7



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารสำหรับการเตรียมหัวเชื้อ (Yeast Malt Extract Medium)

1.1 อาหารเหลว

ในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

สารสกัดจากยีสต์	3.0	กรัม
สารสกัดจากมอลต์	3.0	กรัม
เปปโตเน (Peptone)	5.0	กรัม
กลูโคส	10.0	กรัม

ละลายอาหารในน้ำจืดไอออน ใส่อาหารปริมาตร 50 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

1.2 อาหารวุ้นแข็งลาดเอียง

เตรียมโดยเติมวุ้นผง 20.0 กรัม ลงในสูตรอาหารเหลวข้อ 1.1 ต้มให้วุ้นละลาย จากนั้นเปปตอาหารลงในหลอดทดลองขนาด 16 x 150 มิลลิลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ปิดด้วยจุกสำลี นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำหลอดอาหารมาวางเอียงให้ผิวหน้าของอาหาร มีความยาวประมาณ 12 เซนติเมตร เมื่ออาหารแข็งตัวจึงเก็บเข้าตู้เย็นเพื่อไว้ใช้งานต่อไป

สถาบันนวัตกรรมการ
จุพาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. อาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาวในระดับถึงหมักขนาด 5 ลิตร

ในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

กลูโคส	220.0	กรัม
แอมโมเนียมคลอไรด์	2.0	กรัม
โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.2	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต	0.5	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตโมโนไฮเดรต	0.2	กรัม
สารสกัดจากยีสต์	1.0	กรัม

แยกสารอาหารออกเป็น 3 ส่วน คือ

ส่วนที่ 1 กลูโคส

ส่วนที่ 2 แอมโมเนียมคลอไรด์ โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต แมกนีเซียม

ซัลเฟตเฮปตาไฮเดรตแมกนีเซียมซัลเฟตโมโนไฮเดรต

ส่วนที่ 3 สารสกัดจากยีสต์

นำสารอาหารส่วนที่ 1 ถึง 3 ไปนึ่งฆ่าเชื้อพร้อมถังหมักและสารกำจัดฟอง ที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส ความดัน 7.2 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 30 นาทีและในการทดลองสารที่ใช้ควบคุมความเป็นกรดต่าง คือ โซเดียมไฮดรอกไซด์ ร้อยละ 40 (น้ำหนักต่อปริมาตร)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

1. การเตรียมสารละลายสำหรับการวิเคราะห์กรดมะนาวโดย HPLC

1.1 การเตรียมสารละลายตัวพา (mobile phase) สำหรับการวิเคราะห์กรดมะนาวโดย HPLC

ละลายไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 5 กรัมต่อลิตร ในน้ำที่กำจัดไอออนแล้วอย่างดี ปรับค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 2.00 ด้วยกรดฟอสฟอริก แล้วกรองผ่านกระดาษกรองเซลลูโลสอะซิเตตที่มีขนาด 0.45 ไมครอน กำจัดก๊าซโดยใช้เครื่องกำเนิดคลื่นอัลตราโซนิก (sonicator) เป็นเวลา 25 นาที

1.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐานกรดมะนาว

เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดมะนาวความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร โดยชั่งกรดมะนาวแอนไฮดรัสมาตรฐาน 0.2500 กรัม ละลายด้วยน้ำที่กำจัดไอออนแล้ว ปรับปริมาตรในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร

1.3 การเตรียมสารละลายมาตรฐานสารเปรียบเทียบภายใน (กรดทาร์ทาริก)

เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดทาร์ทาริกเข้มข้น 80 กรัมต่อลิตร โดยชั่งกรดทาร์ทาริกมาตรฐาน 2.000 กรัม ละลายด้วยน้ำที่กำจัดไอออนแล้ว ปรับปริมาตรในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร

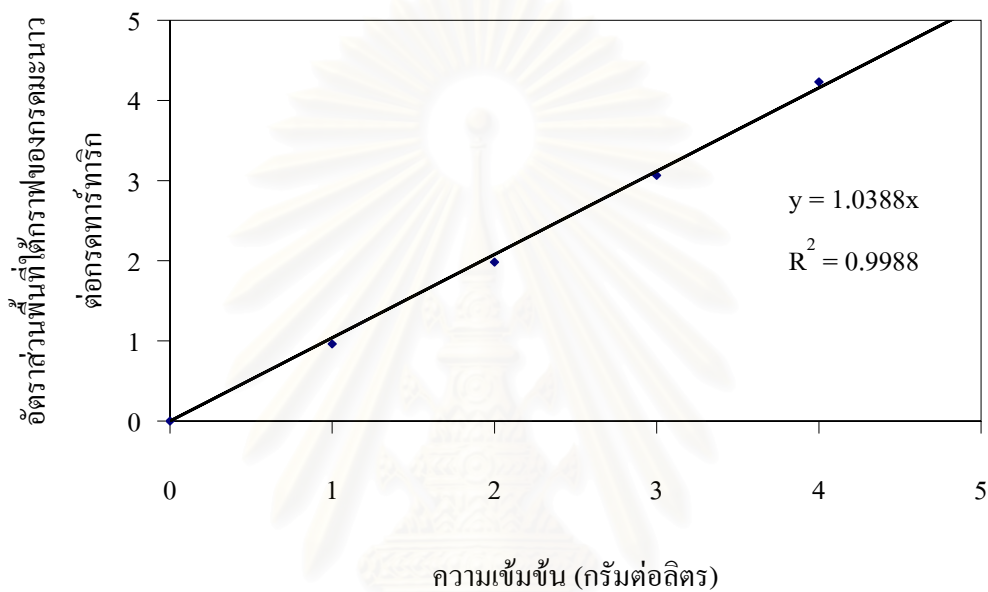
2. การเตรียมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิกสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณกลูโคสที่เหลือ

ละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก 1.0 กรัม ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 2.0 โมลาร์ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน และเติมน้ำกลั่น ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เติมสารโพแทสเซียมทาทเรต ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น และเก็บสารละลายในขวดสีชา

ภาคผนวก ค

กราฟมาตรฐาน

1. กราฟมาตรฐานของกรดมะนาว โดยวิธี HPLC

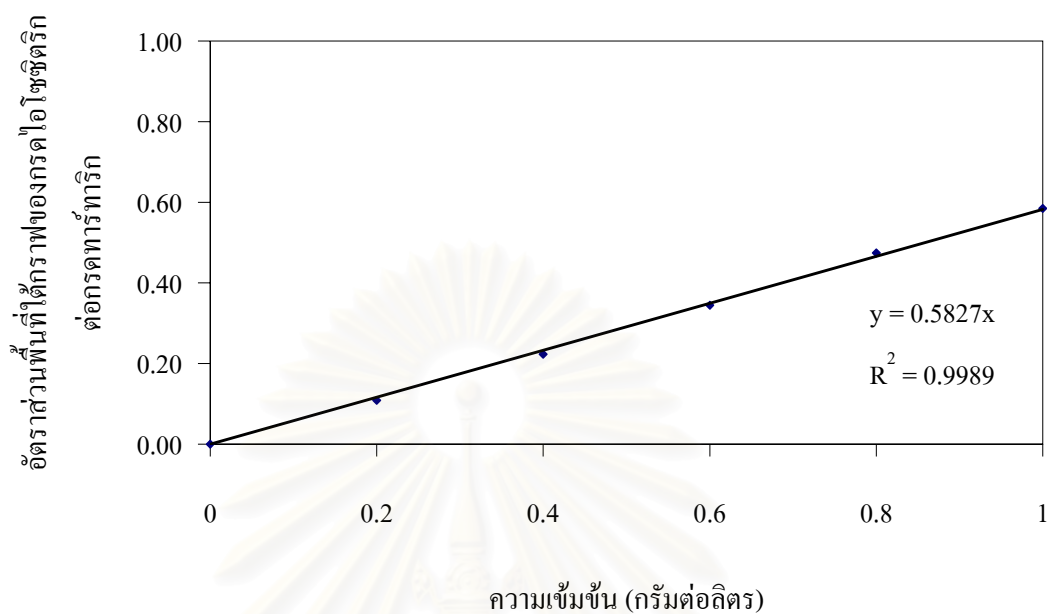


รูปที่ ค.1 กราฟมาตรฐานของกรดมะนาวในช่วงความเข้มข้น 0.0 – 5.0 กรัมต่อลิตร

กรดมะนาว = พื้นที่ใต้กราฟของกรดมะนาวต่อกรดทาร์ทาริก x 1/ความชัน x ความเงือจาง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. กราฟมาตรฐานของกรดไอโซซิติริก โดยวิธี HPLC

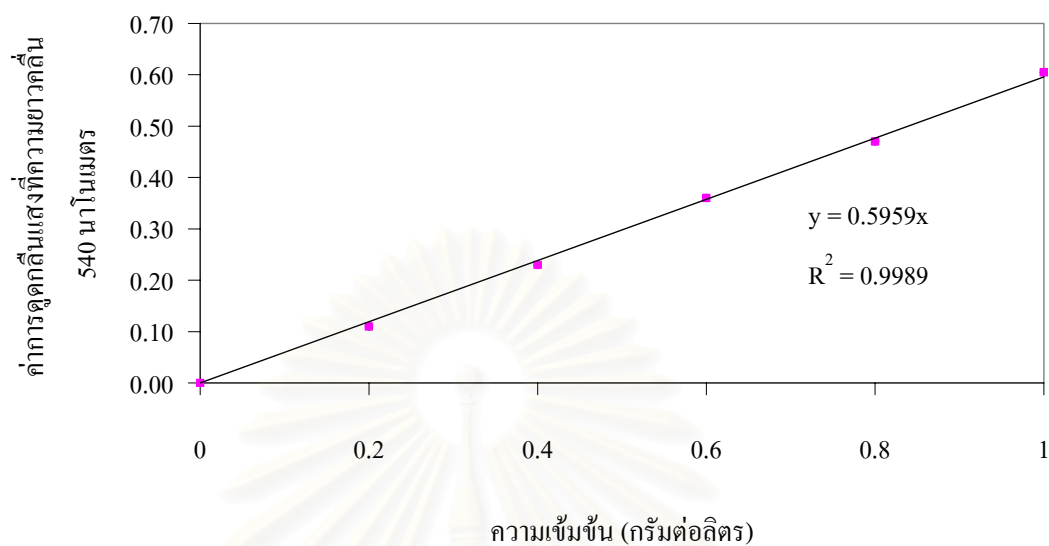


รูปที่ ค.2 กราฟมาตรฐานของกรดไอโซซิติริกในช่วงความเข้มข้น 0.0 – 1.0 กรัมต่อลิตร

กรดไอโซซิติริก = พื้นที่ที่ได้กราฟของกรดไอโซซิติริกต่อกรดทาร์ทาริก x 1/ความชัน x ความเงิอาจ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. กราฟมาตรฐานของกลูโคส



รูปที่ ค.3 กราฟมาตรฐานของกลูโคสในช่วงความเข้มข้น 0.0 -1.0 กรัมต่อลิตร

ปริมาณกลูโคส = ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร x 1/ความชัน x ความเงิอาจ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ง

สูตรการคำนวณค่าทางจลนพลศาสตร์

1. ผลผลิตเซลล์ต่อสับสเตรทที่ใช้, $Y_{x/s}$

$$Y_{x/s} = (x - x_0)/(s_0 - s)$$

เมื่อ	x	=	ความเข้มข้นเซลล์ที่เวลานั้น (กรัมต่อลิตร)
	x_0	=	ความเข้มข้นเซลล์เริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)
	s	=	ความเข้มข้นสับสเตรทที่เวลานั้น (กรัมต่อลิตร)
	s_0	=	ความเข้มข้นสับสเตรทเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)

2. ผลผลิตผลิตภัณฑ์ต่อสับสเตรทที่ใช้, $Y_{p/s}$

$$Y_{p/s} = (p - p_0)/(s_0 - s)$$

เมื่อ	p	=	ปริมาณผลผลิตที่เวลานั้น (กรัมต่อลิตร)
	p_0	=	ปริมาณผลผลิตเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)
	s	=	ความเข้มข้นสับสเตรทที่เวลานั้น (กรัมต่อลิตร)
	s_0	=	ความเข้มข้นสับสเตรทเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)

3. ผลผลิตผลิตภัณฑ์ต่อเซลล์, $Y_{p/x}$

$$Y_{p/x} = (p - p_0)/(x - x_0)$$

เมื่อ	p	=	ปริมาณผลผลิตที่เวลานั้น (กรัมต่อลิตร)
	p_0	=	ปริมาณผลผลิตเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)
	x	=	ความเข้มข้นเซลล์ที่เวลานั้น (กรัมต่อลิตร)
	x_0	=	ความเข้มข้นเซลล์เริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)

4. อัตราการผลิตผลิตภัณฑ์, Productivity (P)

$$P = (p - p_0)/(t - t_0)$$

เมื่อ	p	=	ปริมาณผลผลิตที่เวลานั้น (กรัมต่อลิตร)
	p ₀	=	ปริมาณผลผลิตเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)
	t	คือ	เวลานั้นๆ (ชั่วโมง)
	t ₀	คือ	เวลาเริ่มต้น (ชั่วโมง)



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก จ

ข้อมูลในการทดลอง

ตารางที่ จ.1 น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าอัตราการเจริญจำเพาะของเชื้อ *C. oleophila* NNU-62 ในอาหาร สำหรับเตรียมหัวเชื้อในระดับขวดเขย่าที่ช่วงเวลาเพาะเลี้ยงต่าง ๆ

ชั่วโมงที่	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	อัตราการเจริญจำเพาะ (μ : ชั่วโมง ⁻¹)
0	0.166	-
3	0.202	0.029
6	0.736	0.178
9	2.11	0.460
12	4.23	0.707
15	6.17	0.645
18	6.45	0.093
21	6.33	-0.038
24	6.03	-0.099

ตารางที่ จ.2 น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าอัตราการเจริญจำเพาะของเชื้อ *C. oleophila* NNU-62 ในอาหาร สำหรับเตรียมหัวเชื้อ ในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่ช่วงเวลาเพาะเลี้ยงต่าง ๆ

ชั่วโมงที่	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	อัตราการเจริญจำเพาะ (μ : ชั่วโมง ⁻¹)
0	0.595	-
3	1.42	0.275
6	4.05	0.877
9	8.15	1.367
12	8.73	0.193
15	8.66	-0.023
18	8.62	-0.013
21	8.70	0.027
24	8.72	0.007

ตารางที่ จ.3 ปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิทริก น้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำตาลกลูโคสที่เหลือ ค่า productivity ค่า Yp/s Yx/s และ Yp/x ที่ระยะเวลาต่างๆ ของการหมักเมื่อเลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* NNU-62 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 5 ลิตร

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	กรดไอโซซิทริก (กรัมต่อลิตร)	กลูโคสที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	Productivity (กรัม/ลิตร/ชั่วโมง)	Yp/s	Yx/s	Yp/x
0	0.48	0.00	0.00	215.05	-	-	-	-
12	4.50	0.00	0.00	181.99	0.000	0.000	0.122	0.000
24	10.87	7.84	0.00	167.36	0.327	0.164	0.218	0.755
36	14.06	19.98	4.36	126.50	0.555	0.226	0.153	1.471
48	15.38	30.17	5.63	104.13	0.629	0.272	0.134	2.025
60	15.23	35.88	6.13	77.69	0.598	0.261	0.107	2.433
72	15.33	45.31	6.78	72.41	0.629	0.318	0.104	3.051
84	15.22	64.20	8.46	54.55	0.764	0.400	0.092	4.355
96	15.26	68.62	8.18	41.32	0.715	0.395	0.085	4.643
108	15.07	75.39	9.24	38.02	0.698	0.426	0.082	5.167
120	15.02	76.61	12.70	24.79	0.638	0.403	0.076	5.269

ปริมาตรน้ำหมักที่เหลือในถังหมักประมาณ 2,200 มิลลิลิตร คิดเป็นกรดมะนาวประมาณ 168.54 กรัม

หมายเหตุ Yp/s Yx/s Yp/x คือค่าคำนวณทางจลนพลศาสตร์ที่คิดตั้งแต่ต้นจนถึงเวลาการหมักนั้น

เครื่องหมาย (-) คือไม่สามารถคำนวณได้

ตารางที่ จ.4 ปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิทริก น้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำตาลกลูโคสที่เหลือ ค่า productivity ค่า Y_p/s Y_x/s และ Y_p/x ที่ระยะเวลาต่างๆ ของการหมักเมื่อเลี้ยงเซลล์ตั้ง *C. oleophila* NNU-62 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่อัตราการกวน 50 รอบต่อนาที

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	กรดไอโซซิทริก (กรัมต่อลิตร)	กลูโคสที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	Productivity (กรัม/ลิตร/ชั่วโมง)	Y_p/s	Y_x/s	Y_p/x
0	1.82	0.00	0.00	174.26	-	-	-	-
12	2.22	0.00	0.00	170.12	0.000	0.000	-0.043	0.000
24	2.04	0.00	0.00	163.93	0.000	0.000	0.041	0.000
36	2.64	0.00	0.00	159.79	0.000	0.000	0.133	0.000
48	4.14	0.00	0.00	151.53	0.000	0.000	0.106	0.000
60	4.64	0.39	0.09	149.46	0.007	0.016	0.140	0.113
72	5.68	0.45	0.11	139.13	0.006	0.013	0.113	0.114
84	6.18	0.47	0.11	139.13	0.006	0.013	0.135	0.099
96	6.96	0.53	0.15	139.13	0.006	0.015	0.137	0.110
108	7.02	0.56	0.16	137.07	0.005	0.015	0.158	0.095
120	8.10	0.73	0.17	137.07	0.006	0.020	-0.060	-0.329

ปริมาตรน้ำหมักที่เหลือในถังหมักประมาณ 2,650 มิลลิลิตร คิดเป็นกรดมะนาวประมาณ 1.93 กรัม

หมายเหตุ Y_p/s Y_x/s Y_p/x คือค่าคำนวณทางจลนพลศาสตร์ที่คิดตั้งแต่ต้นจนถึงเวลาการหมักนั้น

เครื่องหมาย (-) คือไม่สามารถคำนวณได้

ตารางที่ จ.5 ปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิทริก น้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำตาลกลูโคสที่เหลือ ค่า productivity ค่า Y_p/s Y_x/s และ Y_p/x ที่ระยะเวลาต่างๆ ของการหมักเมื่อเลี้ยงเซลล์ตั้ง *C. oleophila* NNU-62 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยไม่กวนผสม

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	กรดไอโซซิทริก (กรัมต่อลิตร)	กลูโคสที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	Productivity (กรัม/ลิตร/ชั่วโมง)	Y_p/s	Y_x/s	Y_p/x
0	0.39	0.00	0.00	186.65	-	-	-	-
12	0.94	0.00	0.00	184.59	0.000	0.000	0.267	0.000
24	2.53	0.00	0.00	180.45	0.000	0.000	0.345	0.000
36	2.44	0.00	0.00	170.12	0.000	0.000	0.124	0.000
48	4.60	0.31	0.02	168.06	0.006	0.017	0.226	0.074
60	6.56	1.78	0.15	163.93	0.030	0.078	0.272	0.288
72	9.37	1.40	0.17	157.73	0.019	0.048	0.311	0.156
84	9.24	1.86	0.03	151.53	0.022	0.053	0.252	0.210
96	9.42	2.02	0.04	145.33	0.021	0.049	0.219	0.224
108	9.80	2.92	0.20	139.13	0.027	0.061	0.198	0.310
120	16.97	3.47	0.22	137.07	0.029	0.070	0.334	0.209

ปริมาตรน้ำหมักที่เหลือในถังหมักประมาณ 2,700 มิลลิลิตร คิดเป็นกรดมะนาวประมาณ 9.37 กรัม
 หมายเหตุ Y_p/s Y_x/s Y_p/x คือค่าคำนวณทางจลนพลศาสตร์ที่คิดตั้งแต่ต้นจนถึงเวลาการหมักนั้น
 เครื่องหมาย (-) คือไม่สามารถคำนวณได้

ตารางที่ จ.6 ปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิติริก น้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำตาลกลูโคสที่เหลือ ค่า productivity ค่า Y_p/s Y_x/s และ Y_p/x ที่ระยะเวลาต่างๆ ของการหมัก เมื่อเลี้ยงเซลล์ครั้ง C. *oleophila* NNU-62 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวในถังหมักแบบฟลูอิดไดซ์เบด

เวลา (ชั่วโมงที่)	น้ำหนักเซลล์ แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	กรดไอโซซิติริก (กรัมต่อลิตร)	กลูโคสที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	Productivity (กรัม/ลิตร/ชั่วโมง)	Y_p/s	Y_x/s	Y_p/x
0	0.48	0.00	0.00	161.86	-	-	-	-
12	1.14	0.00	0.00	161.86	0.000	-	-	0.000
24	2.49	0.00	0.00	159.89	0.000	0.000	1.020	0.000
36	3.90	0.00	0.00	153.60	0.000	0.000	0.414	0.000
48	5.50	0.46	0.00	155.66	0.010	0.074	0.810	0.092
60	5.89	1.70	0.11	155.66	0.028	0.274	0.873	0.314
72	7.15	1.35	0.13	151.53	0.019	0.131	0.646	0.202
84	6.81	2.10	0.16	151.53	0.025	0.203	0.613	0.332
96	8.07	3.02	0.20	149.46	0.031	0.244	0.612	0.398
108	8.23	2.45	0.17	147.40	0.023	0.169	0.536	0.316
120	8.20	2.65	0.19	147.40	0.022	0.183	0.534	0.343

ปริมาตรน้ำหมักที่เหลือในถังหมักประมาณ 1,100 มิลลิลิตร คิดเป็นกรดมะนาวประมาณ 2.92 กรัม

หมายเหตุ Y_p/s Y_x/s Y_p/x คือค่าคำนวณทางจลนพลศาสตร์ที่คิดตั้งแต่ต้นจนถึงเวลาการหมักนั้น

เครื่องหมาย (-) คือไม่สามารถคำนวณได้

ตารางที่ จ.7 ปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิทริก น้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำตาลกลูโคสที่เหลือ ค่า productivity ค่า Y_p/s Y_x/s และ Y_p/x ที่ระยะเวลาต่างๆ ของการหมัก เมื่อเลี้ยงเซลล์ *C. oleophila* NNU-62 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 2 ลิตร

เวลา (ชั่วโมงที่)	น้ำหนักเซลล์ แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	กรดไอโซซิทริก (กรัมต่อลิตร)	กลูโคสที่ เหลือ (กรัมต่อลิตร)	ออกซิเจนที่ ละลายน้ำได้ (เปอร์เซ็นต์)	Productivity (กรัม/ลิตร/ชั่วโมง)	Y_p/s	Y_x/s	Y_p/x
0	1.45	0.00	0.00	221.78	72.4	-	-	-	-
12	4.14	0.00	0.00	176.32	14.1	0.000	0.000	0.059	0.000
24	12.15	5.02	2.00	168.06	13.8	0.209	0.093	0.199	0.469
36	14.78	17.30	4.34	159.79	50.5	0.481	0.279	0.215	1.298
48	15.18	23.53	4.48	110.21	51.7	0.490	0.211	0.123	1.714
60	15.86	39.28	7.03	106.10	53.6	0.655	0.340	0.125	2.726
72	15.41	47.73	7.74	97.81	52.6	0.663	0.385	0.113	3.419
84	15.24	49.11	8.04	93.68	52.6	0.585	0.383	0.108	3.561
96	15.30	53.06	7.95	68.88	52.6	0.553	0.347	0.091	3.831
108	14.45	63.53	9.14	48.22	52.6	0.588	0.366	0.075	4.887
120	14.08	73.79	10.24	39.96	52.6	0.615	0.406	0.069	5.842

ปริมาตรน้ำหมักที่เหลือในถังหมักประมาณ 1,100 มิลลิลิตร คิดเป็นกรดมะนาวประมาณ 81.17 กรัม

หมายเหตุ Y_p/s Y_x/s Y_p/x คือค่าคำนวณทางจลนพลศาสตร์ที่คิดตั้งแต่ต้นจนถึงเวลาการหมักนั้น

เครื่องหมาย (-) คือไม่สามารถคำนวณได้

ตารางที่ จ.8 ปริมาณกรดมะนาวที่ถูกดูดซับบนเรซินDowex 1x4-400 ที่ค่าความเป็นกรดต่างๆ

เวลา (ชม.)	ปริมาณกรดมะนาวที่ถูกดูดซับ (กรัมกรดมะนาวต่อกรัมเรซิน)					
	พีเอช 1.90	พีเอช 2.00	พีเอช 3.00	พีเอช 4.00	พีเอช 5.00	พีเอช 6.00
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
1	0.19	0.11	0.06	0.15	0.04	0.06
2	0.14	0.12	0.11	0.16	0.11	0.06
3	0.19	0.13	0.11	0.18	0.13	0.10
4	0.17	0.13	0.15	0.18	0.13	0.07
5	0.19	0.13	0.15	0.17	0.13	0.07

ตารางที่ จ.9 ปริมาณกรดมะนาวที่ถูกดูดซับบนเรซิน Dowex Marathon W BAที่ค่าความเป็นกรดต่างๆ

เวลา (ชม.)	ปริมาณกรดมะนาวที่ถูกดูดซับ (กรัมกรดมะนาวต่อกรัมเรซิน)					
	พีเอช 1.90	พีเอช 2.00	พีเอช 3.00	พีเอช 4.00	พีเอช 5.00	พีเอช 6.00
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
1	0.21	0.21	0.18	0.27	0.28	0.11
2	0.21	0.21	0.25	0.28	0.33	0.09
3	0.19	0.21	0.24	0.29	0.30	0.15
4	0.22	0.27	0.27	0.26	0.33	0.16
5	0.22	0.26	0.27	0.28	0.29	0.16

ตารางที่ จ.10 ปริมาณกรดมะนาวที่ถูกดูดซับบนเรซิน Amberlite XAD-7 ที่ค่าความเป็นกรดต่างๆ

เวลา (ชม.)	ปริมาณกรดมะนาวที่ถูกดูดซับ (กรัมกรดมะนาวต่อกรัมเรซิน)					
	พีเอช 1.90	พีเอช 2.00	พีเอช 3.00	พีเอช 4.00	พีเอช 5.00	พีเอช 6.00
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
1	0.05	0.09	0.03	0.12	0.20	0.14
2	0.06	0.10	0.04	0.22	0.22	0.11
3	0.08	0.15	0.08	0.22	0.32	0.11
4	0.10	0.17	0.11	0.20	0.31	0.08
5	0.12	0.17	0.12	0.20	0.31	0.11

ตารางที่ จ.11 ปริมาณกรดมะนาวที่ถูกดูดซับสูงสุดบนเรซินทั้ง 3 ชนิด

เรซิน	ชนิดของเรซิน	ปริมาณกรดมะนาว ที่ถูกดูดซับสูงสุด (กรัมกรดมะนาวต่อกรัมเรซิน)	ค่าความ เป็นกรด ต่าง
Dowex 1x4-400	เรซินแลกเปลี่ยนไอออนลบ ชนิดแรง	0.19	1.90
Dowex Marathon WBA	เรซินแลกเปลี่ยนไอออนลบ ชนิดอ่อน	0.33	5.00
Amberlite XAD-7	เรซินแบบไม่มีประจุ	0.32	5.00

ตารางที่ จ.12 ปริมาณกรดมะนาวที่ไม่ถูกดูดซับบนเรซิน Dowex Marathon WBA ที่เวลาในการดูดซับต่างๆ

เวลาในการดูดซับ (นาที)	ปริมาณกรดมะนาวที่ไม่ถูกดูดซับ (กรัมกรดมะนาวต่อกรัมเรซิน)
0	2.11
10	1.94
20	1.95
30	1.94
40	1.93
50	1.90
60	1.91

ตารางที่ จ.13 Ion exchange isotherm ของเรซิน Dowex Marathon WBA ในการดูดซับสารละลาย
กรดมะนาวเกรดทางการค้าที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 5.00

ความเข้มข้นกรดมะนาวเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้นกรดมะนาวที่สมดุล (กรัมต่อลิตร) c	ปริมาณกรดมะนาวที่ถูกดูดซับ (กรัมกรดมะนาวต่อกรัมเรซิน) q
0.00	0.00	0.00
10.23	7.26	0.07
19.37	14.28	0.13
29.27	22.13	0.18
38.09	27.65	0.26
52.89	40.31	0.31
58.55	45.27	0.33
68.72	56.56	0.30
85.25	73.36	0.30
96.40	83.09	0.33
103.06	89.50	0.34

ตารางที่ จ.14 Ion exchange isotherm ของเรซิน Dowex Marathon WBA ในการดูดซับกรดมะนาว
ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 5.00

ความเข้มข้นกรดมะนาวเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้นกรดมะนาวที่สมดุล (กรัมต่อลิตร) c	ปริมาณกรดมะนาวที่ถูกดูดซับ (กรัมกรดมะนาวต่อกรัมเรซิน) q
0.00	0.00	0.00
10.96	7.77	0.08
19.44	14.56	0.12
27.06	21.72	0.13
37.50	31.14	0.16
45.57	37.54	0.20
55.53	46.04	0.24
63.23	55.47	0.19
72.57	63.26	0.23
81.99	71.63	0.26
91.09	80.03	0.28

ตารางที่ จ.15 ความเข้มข้นของกรรมะนาวในสารละลายส่วนต่างๆ ที่ผ่านออกจากคอลัมน์ ค่า C_t/C_0 ปริมาณกรรมะนาวที่ผ่านเข้าคอลัมน์ และที่ถูกดูดซับ เมื่อผ่านสารละลายกรรมะนาวเกรดทางการค้า ที่ค่าความเป็นกรดค่าเท่ากับ 5.00 เข้าคอลัมน์ด้วยอัตราการไหล 3.75 มิลลิลิตรต่อชั่วโมงต่อมิลลิลิตรของปริมาตรว่างระหว่างเรซิน

ความเข้มข้นกรรมะนาว (CA) เริ่มต้น ; $C_0 = 95.62$ กรัมต่อลิตร

ลำดับ ส่วนที่	เวลา (นาท)	ปริมาตรสารละลาย ที่ออกจากคอลัมน์ (มิลลิลิตร)	ความเข้มข้นกรรมะนาว ที่ออกจากคอลัมน์ (กรัมต่อลิตร), C_t	ปริมาณกรรมะนาว ที่ออกจากคอลัมน์ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณกรรมะนาว ที่ออกจากคอลัมน์สะสม (กรัมต่อลิตร)	C_t/C_0	ปริมาตรสารละลาย สะสม (มิลลิลิตร)	ปริมาณกรรมะนาวที่ ผ่านเข้าคอลัมน์สะสม (กรัม)	ปริมาณกรรมะนาว ที่ถูกดูดซับ (กรัม)	เปอร์เซ็นต์ การดูดซับ
0	0	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0	0.00	0.00	0.00
1	12	3	0.00	0.00	0.00	0.00	3	0.29	0.29	100.00
2	24	3	2.38	0.01	0.01	0.02	6	0.57	0.57	98.76
3	36	3	17.32	0.05	0.06	0.18	9	0.86	0.80	93.13
4	48	3	39.47	0.12	0.18	0.41	12	1.15	0.97	84.53
5	60	3	51.36	0.15	0.33	0.54	15	1.43	1.10	76.88
6	72	3	59.43	0.18	0.51	0.62	18	1.72	1.21	70.38
7	84	3	60.97	0.18	0.69	0.64	21	2.01	1.32	65.50
8	96	3	61.10	0.18	0.88	0.64	24	2.29	1.42	61.82
9	108	3	61.33	0.18	1.06	0.64	27	2.58	1.52	58.94
10	120	3	61.40	0.18	1.24	0.64	30	2.87	1.62	56.62
11	132	3	62.01	0.19	1.43	0.65	33	3.16	1.73	54.67
12	144	3	63.84	0.19	1.62	0.67	36	3.44	1.82	52.89
13	156	3	66.10	0.20	1.82	0.69	39	3.73	1.91	51.19
14	168	3	66.48	0.20	2.02	0.70	42	4.02	2.00	49.17
15	180	3	74.77	0.22	2.24	0.78	45	4.30	2.06	47.85
16	192	3	84.01	0.25	2.50	0.88	48	4.59	2.09	45.62
17	204	3	86.59	0.26	2.76	0.91	51	4.88	2.12	43.49
18	216	3	86.80	0.26	3.02	0.91	54	5.16	2.15	41.59
19	228	3	89.10	0.27	3.28	0.93	57	5.45	2.17	39.76
20	240	3	91.30	0.27	3.56	0.95	60	5.74	2.18	38.00
21	252	3	95.13	0.29	3.84	0.99	63	6.02	2.18	36.21

ตารางที่ จ.16 ความเข้มข้นของกรดมะนาวในสารละลายส่วนต่างๆ ที่ผ่านออกจากคอลัมน์ ค่า C_i/C_0 ปริมาณกรดมะนาวที่ผ่านเข้าคอลัมน์ และที่ถูกดูดซับ เมื่อผ่านสารละลายกรดมะนาวเกรดทางการค้า ที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 5.00 เข้าคอลัมน์ด้วยอัตราการไหล 7.5 มิลลิลิตรต่อชั่วโมงต่อมิลลิลิตรของปริมาตรว่างระหว่างเรซิน

ความเข้มข้นกรดมะนาว (CA) เริ่มต้น ; $C_0 = 100.88$ กรัมต่อลิตร

ลำดับ ส่วนที่	เวลา (นาท)	ปริมาตรสารละลาย ที่ออกจากคอลัมน์ (มิลลิลิตร)	ความเข้มข้นกรดมะนาว ที่ออกจากคอลัมน์ (กรัมต่อลิตร), C_i	ปริมาณกรดมะนาว ที่ออกจากคอลัมน์ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณกรดมะนาว ที่ออกจากคอลัมน์สะสม (กรัมต่อลิตร)	C_i/C_0	ปริมาตรสารละลาย สะสม (มิลลิลิตร)	ปริมาณกรดมะนาวที่ ผ่านเข้าคอลัมน์สะสม (กรัม)	ปริมาณกรดมะนาว ที่ถูกดูดซับ (กรัม)	เปอร์เซ็นต์ การดูดซับ
0	0	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0	0.00	0.00	0.00
1	6	3	0.00	0.00	0.00	0.00	3	0.29	0.29	100.00
2	12	3	0.00	0.00	0.00	0.00	6	0.57	0.57	100.00
3	18	3	0.00	0.00	0.00	0.00	9	0.86	0.86	100.00
4	24	3	8.72	0.03	0.03	0.09	12	1.15	1.12	97.72
5	30	3	42.74	0.13	0.15	0.42	15	1.43	1.28	89.24
6	36	3	59.70	0.18	0.33	0.59	18	1.72	1.39	80.62
7	42	3	62.90	0.19	0.52	0.62	21	2.01	1.49	74.00
8	48	3	64.03	0.19	0.71	0.63	24	2.29	1.58	68.88
9	54	3	65.23	0.20	0.91	0.65	27	2.58	1.67	64.75
10	60	3	65.43	0.20	1.11	0.65	30	2.87	1.76	61.44
11	66	3	66.04	0.20	1.30	0.65	33	3.16	1.85	58.66
12	72	3	66.48	0.20	1.50	0.66	36	3.44	1.94	56.31
13	78	3	67.31	0.20	1.71	0.67	39	3.73	2.02	54.26
14	84	3	73.99	0.22	1.93	0.73	42	4.02	2.09	52.00
15	90	3	74.65	0.22	2.15	0.74	45	4.30	2.15	50.00
16	96	3	88.83	0.27	2.42	0.88	48	4.59	2.17	47.31
17	102	3	89.13	0.27	2.69	0.88	51	4.88	2.19	44.93
18	108	3	95.46	0.29	2.97	0.95	54	5.16	2.19	42.44
19	114	3	96.29	0.29	3.26	0.95	57	5.45	2.19	40.17
20	120	3	96.78	0.29	3.55	0.96	60	5.74	2.19	38.10
21	126	3	98.29	0.29	3.85	0.97	63	6.02	2.18	36.16
22	132	3	99.98	0.30	4.15	0.99	66	6.31	2.16	34.31

ตารางที่ จ.17 ความเข้มข้นของกรดมะนาวในสารละลายส่วนต่างๆ ที่ผ่านออกจากคอลัมน์ ค่า C_i/C_0 ปริมาณกรดมะนาวที่ผ่านเข้าคอลัมน์ และที่ถูกดูดซับ เมื่อผ่านน้ำหมักกรดมะนาวที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 5.30 เข้าคอลัมน์ด้วยอัตราการไหล 3.75 มิลลิลิตรต่อชั่วโมงต่อมิลลิลิตรของปริมาตรว่างระหว่างเรซิน

ความเข้มข้นกรดมะนาว (CA) เริ่มต้น ; $C_0 = 93.53$ กรัมต่อลิตร

ลำดับส่วนที่	เวลา (นาท)	ปริมาตรสารละลายที่ออกจากคอลัมน์ (มิลลิลิตร)	ความเข้มข้นกรดมะนาวที่ออกจากคอลัมน์ (กรัมต่อลิตร), C_i	ปริมาณกรดมะนาวที่ออกจากคอลัมน์ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณกรดมะนาวที่ออกจากคอลัมน์สะสม (กรัมต่อลิตร)	C_i/C_0	ปริมาตรสารละลายสะสม (มิลลิลิตร)	ปริมาณกรดมะนาวที่ผ่านเข้าคอลัมน์สะสม (กรัม)	ปริมาณกรดมะนาวที่ถูกดูดซับ (กรัม)	เปอร์เซ็นต์การดูดซับ
0	0	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0	0.00	0.00	0.00
1	12	3	0.00	0.00	0.00	0.00	3	0.28	0.28	100.00
2	24	3	0.00	0.00	0.00	0.00	6	0.56	0.56	100.00
3	36	3	13.77	0.04	0.04	0.15	9	0.84	0.80	95.03
4	48	3	59.17	0.18	0.22	0.63	12	1.12	0.90	80.50
5	60	3	79.51	0.24	0.46	0.85	15	1.40	0.95	67.40
6	72	3	81.71	0.25	0.70	0.87	18	1.68	0.98	58.27
7	84	3	82.04	0.25	0.95	0.88	21	1.96	1.02	51.70
8	96	3	82.85	0.25	1.20	0.89	24	2.24	1.05	46.67
9	108	3	83.77	0.25	1.45	0.90	27	2.53	1.08	42.64
10	120	3	84.18	0.25	1.70	0.90	30	2.81	1.10	39.38
11	132	3	85.30	0.26	1.96	0.91	33	3.09	1.13	36.60
12	144	3	85.39	0.26	2.21	0.91	36	3.37	1.15	34.27
13	156	3	85.86	0.26	2.47	0.92	39	3.65	1.18	32.27
14	168	3	86.18	0.26	2.73	0.92	42	3.93	1.20	30.52
15	180	3	86.29	0.26	2.99	0.92	45	4.21	1.22	29.01
16	192	3	86.80	0.26	3.25	0.93	48	4.49	1.24	27.64
17	204	3	86.91	0.26	3.51	0.93	51	4.77	1.26	26.43
18	216	3	87.80	0.26	3.77	0.94	54	5.05	1.28	25.30
19	228	3	88.24	0.26	4.04	0.94	57	5.33	1.29	24.27

ตารางที่ จ.18 ความเข้มข้นของกรดอะมิโนในสารละลายส่วนต่างๆ ที่ผ่านออกจากคอลัมน์ ค่า C_i/C_0 ปริมาณกรดอะมิโนที่ผ่านเข้าคอลัมน์ และที่ถูกดูดซับ เมื่อผ่านน้ำหมักกรดอะมิโนเกรดที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 5.30 เข้าคอลัมน์ด้วยอัตราการไหล 7.5 มิลลิลิตรต่อชั่วโมงต่อมิลลิลิตรของปริมาตรว่างระหว่างเรซิน

ความเข้มข้นกรดอะมิโน (CA) เริ่มต้น ; $C_0 = 93.62$ กรัมต่อลิตร

ลำดับส่วนที่	เวลา (นาท)	ปริมาตรสารละลายที่ออกจากคอลัมน์ (มิลลิลิตร)	ความเข้มข้นกรดอะมิโนที่ออกจากคอลัมน์ (กรัมต่อลิตร), C_i	ปริมาณกรดอะมิโนที่ออกจากคอลัมน์ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณกรดอะมิโนที่ออกจากคอลัมน์สะสม (กรัมต่อลิตร)	C_i/C_0	ปริมาตรสารละลายสะสม (มิลลิลิตร)	ปริมาณกรดอะมิโนที่ผ่านเข้าคอลัมน์สะสม (กรัม)	ปริมาณกรดอะมิโนที่ถูกดูดซับ (กรัม)	เปอร์เซ็นต์การดูดซับ
0	0	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0	0.00	0.00	0.00
1	6	3	0.00	0.00	0.00	0.00	3	0.28	0.28	100.00
2	12	3	0.00	0.00	0.00	0.00	6	0.56	0.56	100.00
3	18	3	4.88	0.01	0.01	0.05	9	0.84	0.83	98.26
4	24	3	25.45	0.08	0.09	0.27	12	1.12	1.03	91.90
5	30	3	63.53	0.19	0.28	0.68	15	1.40	1.12	79.95
6	36	3	78.84	0.24	0.52	0.84	18	1.69	1.17	69.26
7	42	3	80.10	0.24	0.76	0.86	21	1.97	1.21	61.42
8	48	3	81.60	0.24	1.00	0.87	24	2.25	1.24	55.35
9	54	3	82.10	0.25	1.25	0.88	27	2.53	1.28	50.57
10	60	3	83.14	0.25	1.50	0.89	30	2.81	1.31	46.63
11	66	3	83.99	0.25	1.75	0.90	33	3.09	1.34	43.33
12	72	3	84.14	0.25	2.00	0.90	36	3.37	1.37	40.56
13	78	3	85.63	0.26	2.26	0.91	39	3.65	1.39	38.10
14	84	3	87.68	0.26	2.52	0.94	42	3.93	1.41	35.83
15	90	3	88.23	0.26	2.79	0.94	45	4.21	1.42	33.82
16	96	3	89.67	0.27	3.06	0.96	48	4.49	1.44	31.97
17	102	3	90.36	0.27	3.33	0.97	51	4.77	1.45	30.30
18	108	3	91.15	0.27	3.60	0.97	54	5.06	1.45	28.76
19	114	3	91.63	0.27	3.88	0.98	57	5.34	1.46	27.36
20	120	3	92.54	0.28	4.15	0.99	60	5.62	1.46	26.05
21	126	3	92.76	0.28	4.43	0.99	63	5.90	1.47	24.85

ตารางที่ จ.19 ปริมาณกรดมะนาวในสารละลายกรดมะนาวเกรดทางการค้าที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 5.00 ที่ถูกชะออกจากเรซินด้วยสารละลายกรดซัลฟูริกที่ความเข้มข้นต่างๆที่เวลาในการชะต่างๆกัน

เวลา (ชม.ที่)	ปริมาณกรดมะนาวที่ชะได้ (กรัมต่อกรัมเรซิน)					
	0.25 โมลาร์	0.50 โมลาร์	1.0 โมลาร์	1.5 โมลาร์	2.0 โมลาร์	2.5 โมลาร์
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
1	0.20	0.24	0.25	0.23	0.25	0.21
2	0.22	0.22	0.24	0.23	0.23	0.21
3	0.21	0.23	0.24	0.23	0.24	0.22
4	0.21	0.22	0.23	0.23	0.22	0.22
5	0.20	0.23	0.23	0.23	0.22	0.20

ตารางที่ จ.20 ปริมาณกรดมะนาวที่ถูกชะและเปอร์เซ็นต์การชะกรดมะนาวในสารละลายกรดมะนาวเกรดทางการค้าที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 5.00 ออกจากเรซินด้วยสารละลายกรดซัลฟูริกที่ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้น กรดซัลฟูริก (โมลาร์)	ปริมาณ กรดมะนาว ก่อนถูคชะ (กรัม)	ปริมาณ กรดมะนาว หลังถูคชะ (กรัม)	ปริมาณ กรดมะนาว ที่ถูกถูคชะ (กรัม)	ปริมาณ กรดมะนาว ที่ถูกชะ (กรัม)	เปอร์เซ็นต์ การชะ
0.25	2.33	1.59	0.74	0.21	27.97
0.50	2.33	1.90	0.43	0.23	53.63
1.0	2.33	1.94	0.39	0.24	61.34
1.5	2.33	1.92	0.41	0.23	55.55
2.0	2.33	1.98	0.35	0.23	66.32
2.5	2.33	1.98	0.35	0.21	60.00

ตารางที่ จ.21 ปริมาณกรดมะนาวในน้ำหมักกรดมะนาวที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 5.30 ที่ถูกชะออกจากเรซินด้วยสารละลายกรดซัลฟูริกที่ความเข้มข้นต่างๆที่เวลาในการชะต่างๆกัน

เวลา (ชม.ที่)	ปริมาณกรดมะนาวที่ชะได้ (กรัมต่อกรัมเรซิน)					
	0.25 โมลาร์	0.50 โมลาร์	1.0 โมลาร์	1.5 โมลาร์	2.0 โมลาร์	2.5 โมลาร์
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
1	0.17	0.18	0.20	0.21	0.19	0.17
2	0.17	0.20	0.18	0.21	0.19	0.17
3	0.17	0.19	0.18	0.20	0.18	0.17
4	0.18	0.20	0.18	0.21	0.18	0.16
5	0.16	0.18	0.17	0.19	0.18	0.17

ตารางที่ จ.22 เปอร์เซ็นต์การชะกรดมะนาวในน้ำหมักกรดมะนาวที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 5.30 ออกจากเรซินด้วยสารละลายกรดซัลฟูริกที่ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้น กรดซัลฟูริก (โมลาร์)	ปริมาณ กรดมะนาว ก่อนดูดซับ (กรัม)	ปริมาณ กรดมะนาว หลังดูดซับ (กรัม)	ปริมาณ กรดมะนาว ที่ถูกดูดซับ (กรัม)	ปริมาณ กรดมะนาว ที่ถูกชะ (กรัม)	เปอร์เซ็นต์ การชะ
0.25	2.33	1.81	0.52	0.17	32.12
0.50	2.33	1.76	0.57	0.18	31.58
1.0	2.33	1.82	0.51	0.18	35.29
1.5	2.33	1.84	0.49	0.20	41.02
2.0	2.33	1.90	0.43	0.18	42.44
2.5	2.33	1.98	0.35	0.17	47.14

ตารางที่ จ.23 ปริมาณกรดมะนาวในสารละลายกรดมะนาวเกรดทางการค้าที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 5.30 ที่ถูกชะออกจากเรซิน ด้วยสารละลายกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 1.0 โมลาร์ ที่เวลาในการชะต่างๆ กัน

เวลาในการชะ (นาที)	ปริมาณกรดมะนาวที่ชะได้ในสารละลาย (กรัมต่อกรัมเรซิน)
0	0.00
10	0.17
20	0.16
30	0.16
40	0.15
50	0.15
60	0.16

ตารางที่ จ.24 ปริมาณกรดมะนาวในน้ำหมักกรดมะนาวที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 5.30 ที่ถูกชะออกจากเรซินด้วยสารละลายกรดซัลฟูริกที่ความเข้มข้น 1.5 โมลาร์ ที่เวลาในการชะต่างๆ กัน

เวลาในการชะ (นาที)	ปริมาณกรดมะนาวที่ชะได้ในสารละลาย (กรัมต่อกรัมเรซิน)
0	0.00
10	0.11
20	0.11
30	0.11
40	0.11
50	0.11
60	0.11

ตารางที่ จ.25 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิทริก กลูโคสที่เหลือ ค่าความเป็นกรดต่าง และเปอร์เซ็นต์ออกซิเจนที่ละลายน้ำได้ ของการหมักที่เวลาต่างๆ เมื่อเลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* NNU-62 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 2 ลิตร รูปแบบการผลิตแบบ extractive fermentation หยุดควบคุมค่าความเป็นกรดต่างตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24

เวลา (ชั่วโมง ที่)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	กรดไอโซซิทริก (กรัมต่อลิตร)	กลูโคสที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	DO (%Sat)	pH	Productivity (กรัม/ลิตร/ชั่วโมง)	Yp/s	Yx/s	Yp/x
0	1.55	0.00	0.00	207.31	90.0	5.76	-	-	-	-
12	2.72	0.00	0.00	174.26	50.0	5.22	0.000	0.000	0.035	0.000
24	8.91	3.29	1.00	161.86	49.6	4.82	0.137	0.072	0.162	0.447
36	12.39	7.34	2.19	126.74	70.9	3.16	0.204	0.091	0.135	0.677
48	11.54	8.71	2.39	99.88	81.6	2.93	0.181	0.081	0.093	0.872
60	12.28	10.66	2.87	95.74	88.7	2.82	0.178	0.096	0.096	0.993
72	11.51	11.61	3.17	85.41	91.1	2.79	0.161	0.095	0.082	1.166
84	11.24	12.16	3.51	75.08	88.6	2.71	0.145	0.092	0.073	1.255
96	10.91	13.80	4.11	68.88	97.3	2.65	0.144	0.100	0.068	1.474
108	10.72	13.45	4.21	68.88	88.6	2.64	0.125	0.097	0.066	1.467
120	10.14	15.34	4.90	64.75	101.4	2.64	0.128	0.108	0.060	1.786

ปริมาตรน้ำหมักที่เหลือในถังหมักประมาณ 1,060 มิลลิลิตร คิดเป็นกรดมะนาวประมาณ 16.26 กรัม

ปริมาณกรดมะนาวที่ได้จากการดูดซับด้วยคอลัมน์แลกเปลี่ยนไอออนลบประมาณ 12.87 กรัม

คิดเป็นปริมาณกรดมะนาวทั้งหมด 29.13 กรัม

ตารางที่ จ.26 ปริมาณและความเข้มข้นของกรดมะนาวในลำดับส่วนต่างๆ ของสารละลายที่ได้จากการชะคอลลัมน์แลกเปลี่ยนไอออนด้วยสารละลายกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 1.5 โมลาร์ ของการหมักแบบ extractive fermentation ที่หยุดควบคุมค่าความเป็นกรดค้างตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24

ลำดับส่วนที่	ปริมาตรสารละลาย ตัวชะที่ผ่านออกจาก คอลัมน์ (มิลลิลิตร)	ความเข้มข้นกรดมะนาว ในสารละลาย (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณกรดมะนาวที่ถูก ชะออกจากคอลัมน์(กรัม)
1	100	0.00	0.00
2	100	4.42	0.442
3	100	9.13	0.913
4	100	14.51	1.451
5	100	12.97	1.297
6	100	8.81	0.881
7	100	6.26	0.626
8	100	6.20	0.620
9	100	7.33	0.733
10	100	7.44	0.744
11	100	8.11	0.811
12	100	8.16	0.816
13	100	8.16	0.816
14	100	7.85	0.785
15	100	7.70	0.770
16	100	6.42	0.642
17	100	5.23	0.523
18	100	0.00	0.000
ปริมาณกรดมะนาวทั้งหมดที่ชะได้ = 12.87 กรัม			
ปริมาตรสารละลายตัวชะที่ใช้ = 1,800 มิลลิลิตร			

ตารางที่ จ.27 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิทริก กลูโคสที่เหลือ ค่าความเป็นกรดต่าง และเปอร์เซ็นต์ออกซิเจนที่ละลายน้ำได้ ของการหมักที่เวลาต่างๆ เมื่อเลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* NNU-62 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 2 ลิตร รูปแบบการผลิตแบบ extractive fermentation ควบคุมค่าความเป็นกรดต่างทุกๆ 12 ชั่วโมง

เวลา (ชั่วโมง ที่)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	กรดไอโซซิทริก (กรัมต่อลิตร)	กลูโคสที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	DO (%Sat)	pH	Productivity (กรัม/ลิตร/ชั่วโมง)	Yp/s	Yx/s	Yp/x
0	1.23	0.00	0.00	201.12	93.6	5.54	-	-	-	-
12	2.39	0.00	0.00	186.65	50.4	5.25	0.000	0.000	0.080	0.000
24	10.79	4.25	1.76	180.45	45.2	4.85	0.177	0.206	0.463	0.445
36	13.66	14.56	5.79	139.13	49.9	3.39	0.404	0.235	0.201	1.171
48	14.13	22.32	6.69	99.88	50.6	3.52	0.465	0.220	0.127	1.730
60	14.18	25.10	6.37	73.02	49.8	3.48	0.418	0.196	0.101	1.938
72	17.01	33.91	7.90	68.88	52.6	3.44	0.471	0.256	0.119	2.149
84	14.39	41.65	9.25	52.36	70.9	3.41	0.496	0.280	0.088	3.165
96	14.68	61.25	13.25	50.29	70.6	4.01	0.638	0.406	0.089	4.554
108	16.19	53.74	11.48	35.83	77.0	3.98	0.498	0.325	0.091	3.592
120	13.28	47.63	10.10	23.43	77.5	3.88	0.397	0.268	0.068	3.953

ปริมาตรน้ำหมักที่เหลือในถังหมักประมาณ 1,200 มิลลิลิตร คิดเป็นกรดมะนาวประมาณ 57.16 กรัม

ปริมาณกรดมะนาวที่ได้จากการดูดซับด้วยคอลัมน์แลกเปลี่ยนไอออนลบประมาณ 8.89 กรัม

คิดเป็นปริมาณกรดมะนาวทั้งหมด 66.05 กรัม

ตารางที่ จ.28 ปริมาณและความเข้มข้นของกรดมะนาวในลำดับส่วนต่างๆ ของสารละลายที่ได้จากการชะคอดีมันต์แลกเปลี่ยนไอออนด้วยสารละลายกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 1.5 โมลาร์ จากการหมักแบบ extractive fermentation ที่ทำการปรับค่าความเป็นกรดต่างๆ 12 ชั่วโมง

ลำดับส่วนที่	ปริมาตรสารละลายตัวชะที่ผ่านออกจากคอดีมันต์ (มิลลิลิตร)	ความเข้มข้นกรดมะนาวในสารละลาย (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณกรดมะนาวที่ถูกระบายออกจากคอดีมันต์ (กรัม)
1	100	0.00	0.00
2	100	2.02	0.202
3	100	29.48	2.948
4	100	11.96	1.196
5	100	10.13	1.013
6	100	9.64	0.964
7	100	6.81	0.681
8	100	3.99	0.399
9	100	3.55	0.355
10	100	2.99	0.299
11	100	2.72	0.272
12	100	2.49	0.249
13	100	1.54	0.154
14	100	1.51	0.151
15	100	0.00	0.000
ปริมาณกรดมะนาวทั้งหมดที่ชะได้ = 8.89 กรัม			
ปริมาตรสารละลายตัวชะที่ใช้ = 1,500 มิลลิลิตร			

ตารางที่ จ.29 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิทริก กลูโคสที่เหลือ ค่าความเป็นกรดต่าง และเปอร์เซ็นต์ออกซิเจนที่ละลายน้ำได้ ของการหมักที่เวลาต่างๆ เมื่อเลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* NNU-62 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 2 ลิตร รูปแบบการผลิตแบบ extractive fermentation ควบคุมค่าความเป็นกรดต่างตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 จนถึงสิ้นสุดการทดลอง

เวลา (ชั่วโมง ที่)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	กรดไอโซซิทริก (กรัมต่อลิตร)	กลูโคสที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	DO (%Sat)	pH	Productivity (กรัม/ลิตร/ชั่วโมง)	Yp/s	Yx/s	Yp/x
0	0.45	0.00	0.00	205.25	94.7	5.58	-	-	-	-
12	3.85	0.00	0.00	182.52	49.7	5.24	0.000	0.000	0.150	0.000
24	12.30	6.23	3.19	176.32	49.8	4.95	0.260	0.215	0.410	0.526
36	14.61	19.54	7.14	172.19	49.7	4.98	0.543	0.591	0.428	1.380
48	14.89	29.92	7.98	116.40	51.7	4.94	0.623	0.337	0.163	2.072
60	14.54	36.05	7.84	106.07	62.4	5.18	0.601	0.363	0.142	2.559
72	14.19	43.20	8.75	97.81	83.2	4.95	0.600	0.402	0.128	3.144
84	12.15	47.40	9.15	77.15	86.0	5.11	0.564	0.370	0.091	4.051
96	11.68	51.45	9.80	60.62	105.2	4.95	0.536	0.356	0.078	4.581
108	11.72	55.35	9.86	48.22	116.5	4.94	0.513	0.352	0.072	4.911
120	11.26	59.99	10.40	48.22	120.6	4.95	0.500	0.382	0.069	5.549

ปริมาตรน้ำหมักที่เหลือในถังหมักประมาณ 1,100 มิลลิลิตร คิดเป็นกรดมะนาวประมาณ 65.99 กรัม

ปริมาณกรดมะนาวที่ได้จากการดูดซับด้วยคอลัมน์แลกเปลี่ยนไอออนลบประมาณ 4.33 กรัม

คิดเป็นปริมาณกรดมะนาวทั้งหมด 70.32 กรัม

ตารางที่ จ.30 ปริมาณและความเข้มข้นของกรดมะนาวในลำดับส่วนต่างๆ ของสารละลายที่ได้จากการชะคอลลัมน์แลกเปลี่ยนไอออนด้วยสารละลายกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 1.5 โมลาร์ จากการหมักแบบ extractive fermentation ที่ทำการปรับค่าความเป็นกรดต่างตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 จนถึงสิ้นสุดการทดลอง

ลำดับส่วนที่	ปริมาตรสารละลายตัวชะที่ผ่านออกจากคอลัมน์ (มิลลิลิตร)	ความเข้มข้นกรดมะนาวในสารละลาย (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณกรดมะนาวที่ถูกระบายออกจากคอลัมน์ (กรัม)
1	100	0.00	0.00
2	100	0.39	0.039
3	100	4.79	0.479
4	100	19.57	1.957
5	100	11.37	1.137
6	100	4.78	0.478
7	100	1.70	0.170
8	100	0.60	0.600
9	100	0.12	0.120
10	100	0.00	0.000
ปริมาณกรดมะนาวทั้งหมดที่ชะได้ = 4.33 กรัม			
ปริมาตรสารละลายตัวชะที่ใช้ = 1,000 มิลลิลิตร			

ตารางที่ จ.31 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิทริก กลูโคสที่เหลือ ค่าความเป็นกรดต่าง และเปอร์เซ็นต์ออกซิเจนที่ละลายน้ำได้ ของการหมักที่เวลาต่างๆ เมื่อเลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* NNU-62 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 2 ลิตร รูปแบบการผลิตแบบ extractive fermentation ควบคุมค่าความเป็นกรดต่างตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 จนถึงสิ้นสุดการทดลอง แยกด้วยคอลัมน์แลกเปลี่ยนไอออน 2 คอลัมน์

เวลา (ชั่วโมง ที่)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	กรดไอโซซิทริก (กรัมต่อลิตร)	กลูโคสที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	DO (%Sat)	pH	Productivity (กรัม/ลิตร/ชั่วโมง)	Yp/s	Yx/s	Yp/x
0	1.48	0.00	0.00	268.32	95.5	5.59	-	-	-	-
12	3.19	0.00	0.00	228.08	39.9	5.26	0.000	0.000	0.042	0.000
24	11.04	4.74	1.98	199.68	39.8	4.94	0.198	0.069	0.139	0.496
36	16.72	13.11	3.69	171.27	40.0	4.94	0.364	0.135	0.157	0.860
48	21.19	23.58	4.87	147.60	40.2	4.94	0.491	0.195	0.163	1.196
60	17.13	55.03	10.77	112.10	47.1	4.94	0.917	0.352	0.100	3.516
72	15.15	62.69	10.47	95.53	87.0	4.94	0.871	0.363	0.079	4.586
84	16.34	62.54	9.01	69.49	98.3	4.94	0.745	0.315	0.075	4.209
96	19.72	89.67	11.79	57.66	97.8	4.95	0.934	0.426	0.087	4.916
108	19.12	76.99	9.79	42.27	107.1	4.94	0.713	0.341	0.078	4.365
120	20.28	72.25	8.77	26.89	107.8	4.94	0.602	0.299	0.078	3.843

ปริมาตรน้ำหมักที่เหลือในถังหมักประมาณ 1,100 มิลลิลิตร คิดเป็นกรดมะนาวประมาณ 79.48 กรัม

ปริมาณกรดมะนาวที่ได้จากการดูดซับด้วยคอลัมน์แลกเปลี่ยนไอออนลบ คอลัมน์ที่ 1 ประมาณ 8.50 กรัม

ปริมาณกรดมะนาวที่ได้จากการดูดซับด้วยคอลัมน์แลกเปลี่ยนไอออนลบ คอลัมน์ที่ 2 ประมาณ 2.52 กรัม

คิดเป็นปริมาณกรดมะนาวทั้งหมด 90.50 กรัม

ตารางที่ จ.32 ปริมาณและความเข้มข้นของกรดมะนาวในลำดับส่วนต่างๆ ของสารละลายที่ได้จากการชะคอลลัมน์แลกเปลี่ยนไอออนคอลลัมน์ที่ 1 ด้วยสารละลายกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 1.5 โมลาร์ จากการหมักแบบ extractive fermentation ที่ทำการปรับค่าความเป็นกรดต่างตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 จนถึงสิ้นสุดการทดลอง

ลำดับส่วนที่	ปริมาตรสารละลายตัวชะที่ผ่านออกจากคอลลัมน์ (มิลลิลิตร)	ความเข้มข้นกรดมะนาวในสารละลาย (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณกรดมะนาวที่ถูกระบายออกจากคอลลัมน์ (กรัม)
1	100	0.00	0.00
2	100	1.48	0.148
3	100	13.06	1.306
4	100	18.63	1.563
5	100	22.58	2.258
6	100	12.92	1.292
7	100	7.24	0.724
8	100	4.15	0.415
9	100	2.94	0.294
10	100	1.99	0.199
11	100	0.00	0.00
ปริมาณกรดมะนาวทั้งหมดที่ชะได้ = 8.50 กรัม			
ปริมาตรสารละลายตัวชะที่ใช้ = 1,100 มิลลิลิตร			

ตารางที่ จ.33 ปริมาณและความเข้มข้นของกรดมะนาวในลำดับส่วนต่างๆ ของสารละลายที่ได้จากการชะคอลลัมน์แลกเปลี่ยนไอออนคอลลัมน์ที่ 2 ด้วยสารละลายกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 1.5 โมลาร์ จากการหมักแบบ extractive fermentation ที่ทำการปรับค่าความเป็นกรดต่างตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 จนถึงสิ้นสุดการทดลอง

ลำดับส่วนที่	ปริมาตรสารละลายตัวชะที่ผ่านออกจากคอลลัมน์ (มิลลิลิตร)	ความเข้มข้นกรดมะนาวในสารละลาย (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณกรดมะนาวที่ถูกระบายออกจากคอลลัมน์ (กรัม)
1	100	0.00	0.00
2	100	3.01	0.301
3	100	3.38	0.338
4	100	3.26	0.326
5	100	3.24	0.324
6	100	2.98	0.298
7	100	2.71	0.271
8	100	2.73	0.273
9	100	2.39	0.239
10	100	1.55	0.155
11	100	0.00	0.00
ปริมาณกรดมะนาวทั้งหมดที่ชะได้ = 2.52 กรัม			
ปริมาตรสารละลายตัวชะที่ใช้ = 1,100 มิลลิลิตร			

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวอุดมพร มณีรัตน์ เกิดวันที่ 3 มกราคม พ.ศ. 2521 ที่จังหวัดเชียงราย สำเร็จการศึกษาหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพทางอุตสาหกรรมเกษตร) คณะอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ในปีการศึกษา 2543 จากนั้นเข้าศึกษาต่อหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2545



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย