บทที่ 4

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การศึกษาลักษณะการเจริญของเชื้อ *C. oleophila* C-73 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการเจริญเติบโต

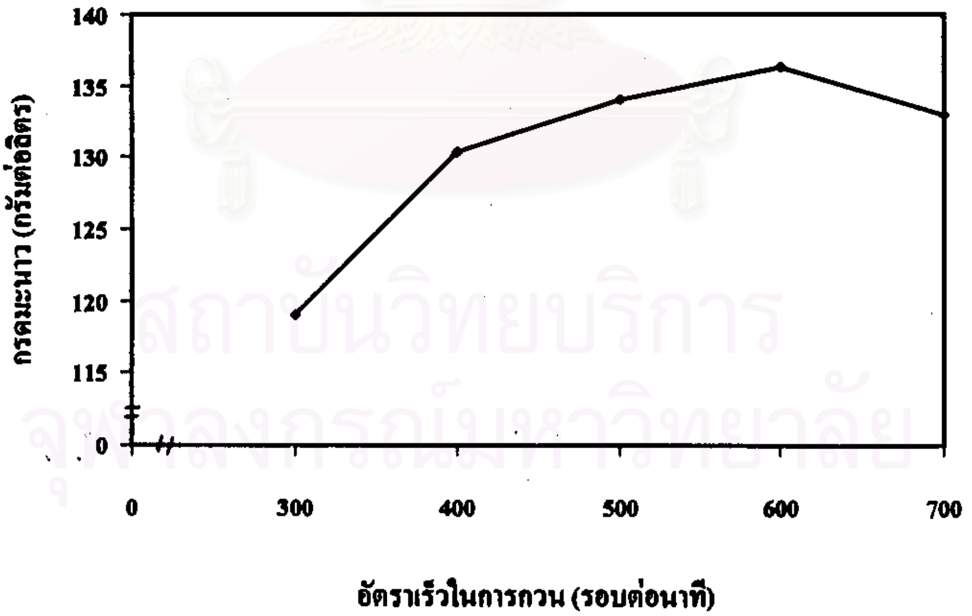
การเลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* C-73 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการเจริญเติบโต พบว่าเชื้อเริ่มเข้าสู่การเจริญในระยะทวีคูณตั้งแต่ชั่วโมงที่ 3 เข้าสู่ช่วงปลายระยะทวีคูณในชั่วโมงที่ 21 และเข้าสู่การเจริญในระยะคงที่ในชั่วโมงที่ 21-30 งานวิจัยนี้จึงเลือกใช้ยีสต์ที่เจริญในช่วงกลางของการเจริญระยะทวีคูณคือชั่วโมงที่ 15-18 ไปทำการตรึงเซลล์ด้วยแคลเซียมอัลจิเนตเพื่อนำไปผลิตกรดมะนาว เนื่องจากเซลล์ในช่วงนี้เป็นระยะที่เซลล์แข็งแรงและมีแอกติวิตี้ภายในเซลล์สูงสุด (วราวุฒิ, 2530)

2. การศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดมะนาวจากเซลล์ตรึง *C. oleophila* C-73 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

2.1 ผลของอัตราการกวนที่เหมาะสมสำหรับผลิตกรดมะนาวจากเซลล์ตรึง *C. oleophila* C-73 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

ทำการแปรผันอัตราการกวน 300, 400, 500, 600 และ 700 รอบต่อนาที เมื่อควบคุมอัตราการกวน 300 และ 400 รอบต่อนาที พบว่าอัตราการผลิตกรดมะนาวต่ำคือ 22.71 และ 23.88 กรัมต่อลิตรต่อวัน และผลผลิตกรดมะนาว 119.70 และ 130.38 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 7 ของการหมักตามลำดับ เมื่อเพิ่มอัตราการกวนเป็น 500 รอบต่อนาที อัตราการผลิตกรดมะนาวเพิ่มขึ้นเป็น 30.44 กรัมต่อลิตรต่อวัน ผลผลิตกรดมะนาว 134.38 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 7 ของการหมัก แต่เมื่อเพิ่มอัตราการกวนเป็น 600 และ 700 รอบต่อนาที อัตราการผลิตกรดมะนาวเพิ่มขึ้นเท่ากันคือ 34 กรัมต่อลิตรต่อ

วัน ผลผลิตกรดมะนาวสูงสุดคือ 136.45 และ 133.04 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 7 ของการหมัก ผลผลิตกรดมะนาวที่ได้กับปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ถูกใช้ไปในวันที่ 7 ของการหมักเท่ากับ 61.03, 61.83, 62.05 และ 61.86 ตามลำดับ ที่อัตราการกวนเพิ่มมากขึ้นเกิน 600 รอบต่อนาที ผลผลิตกรดมะนาวที่ได้ลดลงเนื่องจากที่อัตราการกวนสูงๆจะทำให้เกิดแรงเค้น(shear stress)ซึ่งเป็นอันตรายต่อเซลล์จุลินทรีย์(Scragg, 1991) ทำให้อัตราการผลิตกรดมะนาวลดลง(แสดงดังรูปที่ 9) และที่อัตราการกวนสูงอาจทำให้เม็ดเซลล์ตรึงแตก เมื่อพิจารณาจากอัตราการผลิตกรดมะนาว ผลผลิตกรดมะนาวสูงสุดและเสถียรภาพของเม็ดเซลล์ตรึง จึงเลือกใช้อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที ในการผลิตกรดมะนาวจากเซลล์ตรึง*C. oleophila* C-73 ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับการผลิตกรดมะนาวจากเซลล์อิสระของ *C. oleophila* C-73 ของประเสริฐ หาญเมืองใจ(2537) ซึ่งใช้อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที จะให้ผลผลิตกรดมะนาวสูงสุด



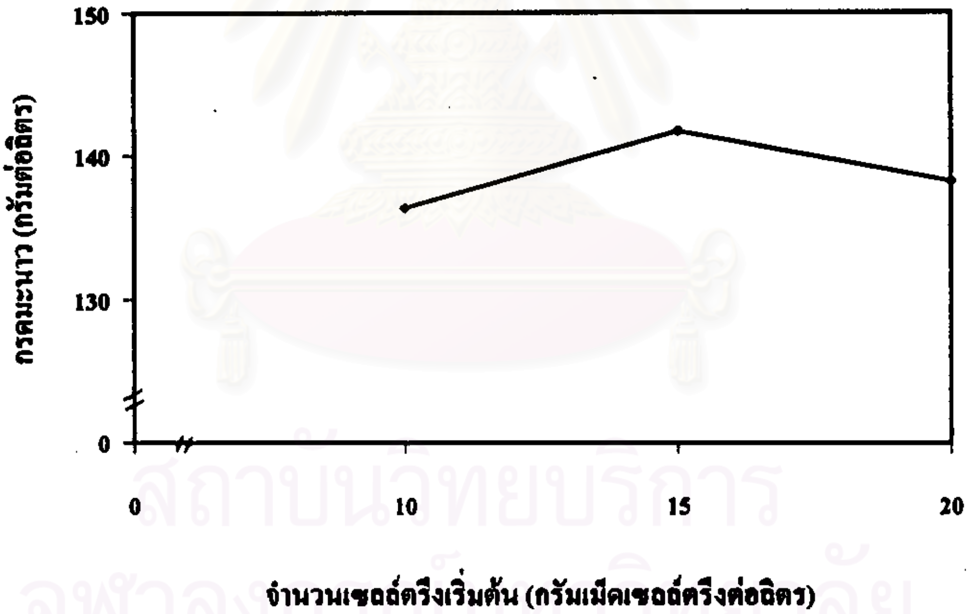
รูปที่ 9 เปรียบเทียบผลของการกวนที่มีต่อการหมักกรดมะนาวจากเซลล์ตรึง *C. oleophila* C-73 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

เนื่องจากการผลิตกรดมะนาวโดยยีสต์ เป็นการหมักในสภาวะที่ต้องการออกซิเจน Rane และ Sims (1993 และ 1994) และ Okashi และคณะ (1987) ได้รายงานการปริมาณออกซิเจนที่ละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อ จะทำให้ผลผลิตกรดมะนาวเพิ่มขึ้นและปริมาณกรดไอโซซิตริกจะลดลง การกวน (agitation) อาหารเลี้ยงเชื้อเป็นวิธีหนึ่งที่ช่วยเพิ่มปริมาณการละลายและการถ่ายเทออกซิเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ดีขึ้น Furukawa และคณะ (1977) ได้รายงานผลการผลิตกรดมะนาวจากเซลล์อิสระ *C. citrica* ในอาหารที่มีนอร์มัล-พาราฟฟินส์ เมื่อทำแปรผันอัตราการกวนอาหารเลี้ยงเชื้อในช่วง 250-600 รอบต่อนาที พบว่าอัตราการกวนที่เหมาะสมคือ 600 รอบต่อนาที ในการใช้เซลล์ตรึงผลิตกรดมะนาวจึงจะต้องใช้การกวนสูงเพื่อให้เซลล์ตรึงสัมผัสอากาศและอาหารได้ดี การกวนทำให้การละลายและการถ่ายเทอากาศได้ดียิ่งขึ้น จึงอาจทำให้เซลล์ตรึงมีการผลิตกรดมะนาวสูงกว่าการใช้เซลล์อิสระ Hamada และคณะ (1990) รายงานว่าเซลล์ที่อยู่ภายในเซลล์ตรึงมีอิทธิพลและมีความสำคัญในการช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของการผลิตผลิตภัณฑ์ อีกทั้ง Maddox และ Kingston (1983) ได้รายงานผลผลิตกรดมะนาวเมื่อใช้เซลล์อิสระมีค่าน้อยกว่าเมื่อใช้เซลล์ตรึงด้วยโพลิอะคริลาไมด์เป็นสารพาหะเล็กน้อย

2.2 ผลของปริมาณเซลล์ตรึงเริ่มต้นที่เหมาะสม

เมื่อใช้ปริมาณเซลล์ตรึงเริ่มต้น 10, 15 และ 20 กรัมต่อลิตรในการผลิตกรดมะนาว เมื่อจำนวนเซลล์ตรึงเพิ่มขึ้นพบว่าทำให้การเจริญเพิ่มขึ้นอัตราการผลิตกรดมะนาวเพิ่มมากขึ้นและเร็วขึ้น เมื่อใช้ปริมาณเซลล์ตรึงเริ่มต้น 10 กรัมต่อลิตร ให้ผลผลิตกรดมะนาวสูงสุดในวันที่ 7 ของการหมักคือ 136.45 กรัมต่อลิตร อัตราการผลิตกรดมะนาว 34 กรัมต่อลิตรต่อวัน เมื่อเพิ่มปริมาณเซลล์ตรึงเป็น 15 และ 20 กรัมเม็ดเซลล์ตรึงต่อลิตร พบว่าอัตราการผลิตได้ใกล้เคียงกันอัตราการผลิตกรดมะนาวเท่ากับ 45 และ 44 กรัมต่อลิตรต่อวัน ผลผลิตกรดมะนาว 141.72 และ 138.23 กรัมต่อลิตรใน

วันที่ 6 ของการหมัก เมื่อเทียบผลผลิตกรดมะนาวที่ได้กับปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ถูกใช้ไปคือ 63.50, 68.75 และ 66.56 ตามลำดับ ปริมาณเซลล์ตรึง 15 กรัมเม็ดเซลล์ตรึงต่อลิตรให้ผลผลิตกรดมะนาวเพิ่มขึ้นร้อยละ 5.25 ขณะที่ จำนวนเซลล์ตรึง 20 กรัมเม็ดเซลล์ตรึงต่อลิตรเพิ่มขึ้นร้อยละ 3.08 เมื่อเทียบกับเซลล์ตรึงเริ่มต้น 10 กรัมเม็ดเซลล์ตรึงต่อลิตร ดังนั้นปริมาณเริ่มต้นที่เหมาะสม คือ 15 กรัมเม็ดเซลล์ตรึงต่อลิตร จึงเหมาะที่จะใช้ผลิตกรดมะนาวจากเซลล์ตรึงในถังหมักขนาด 5 ลิตร (แสดงดังรูปที่ 10) สอดคล้องกับ Rymowicz และคณะ (1993) รายงานว่าความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นในเม็ดเซลล์ตรึงร้อยละ 10 (น้ำหนักเปียก) จะให้ผลผลิตกรดมะนาวสูงสุด เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเซลล์มากเกินไปทำให้ผลผลิตกรดมะนาวต่ำลง



รูปที่ 10 เปรียบเทียบปริมาณเซลล์ตรึงเริ่มต้นที่ใช้ในการหมักกรดมะนาวจากเซลล์ตรึง *C. oleophila* C-73 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

2.3 ผลของการหมักแบบ Fed-batch fermentation

การหมักแบบ Fed-batch fermentation เป็นเทคนิคการหมักแบบ batch แต่มีการเติมสารที่จำกัดการเจริญเข้าไปในถังหมักในระหว่างการหมัก จากรายงานของ Hossain และคณะ (1984; อ้างถึงใน Dawson และ Maddox, 1988) อัตราการผลิตกรดมะนาวสูงสุดเมื่อมีสารอาหารจำกัดการเจริญ (โดยเฉพาะไนโตรเจน) ในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตกรดมะนาวและในการหมักกรดมะนาวจากเซลล์ตรึง *C. oleophila* C-73 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร จะต้องใช้น้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นสูง 200-220 กรัมต่อลิตร ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นสูง ๆ มีผลทำให้อัตราการเจริญช้า ผลผลิตกรดมะนาวลดลงไปด้วย จากรายงานของ Shu และ Johnson (อ้างถึงใน Honecker *et al.* 1989) การผลิตกรดมะนาวจากเซลล์อิสระ *A. niger* ต้องการความเข้มข้นของน้ำตาลสูง เพื่อเพิ่มแรงดันออสโมติกให้สูงขึ้น จึงจะเหมาะสมกับการผลิตกรดมะนาว ซึ่งตรงกันข้ามกับเมื่อใช้เซลล์ตรึง การสะสมของกรดมะนาวเพิ่มมากขึ้นเมื่อมีความเข้นของน้ำตาลเริ่มต้นต่ำ

ในงานวิจัยการทดลองการหมักแบบ Fed-batch fermentation ทำการเติมน้ำตาลกลูโคสเข้าไปในถังหมักในชั่วโมงที่ 48 ของการหมัก อัตราการเติมน้ำตาลกลูโคส 4.0 กรัมต่อชั่วโมง เซลล์ตรึง *C. oleophila* C-73 สามารถผลิตกรดมะนาวได้ 136.81 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 5 ของการหมัก อัตราการผลิตกรดมะนาว 36 กรัมต่อลิตรต่อวัน คิดเป็นผลผลิตกรดมะนาวที่ได้กับปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ถูกใช้ไปคิดเป็นร้อยละ 68.38 เมื่อเปรียบเทียบกับการหมักแบบ batch จะพบว่าการหมักแบบ Fed-batch จะสามารถผลิตกรดมะนาวได้เร็วกว่าซึ่งในแบบ batch จะให้ผลผลิตสูงสุดในวันที่ 7 ของการหมัก สอดคล้องกับรายงานของ Dawson และ Maddox (1988) ผลผลิตกรดมะนาวจากการหมักแบบ Fed-batch fermentationจะเป็น 2 เท่าของการหมักแบบ batch fermentation การที่ผลผลิตกรดมะนาว

สูงกว่าและอัตราการผลิตเร็วกว่าอาจเนื่องมาจากอัตราการเจริญใน Fed-batch fermentation สูงกว่า ผลผลิตกรดมะนาวจึงเพิ่มมากขึ้นและเร็วขึ้นตามไปด้วย

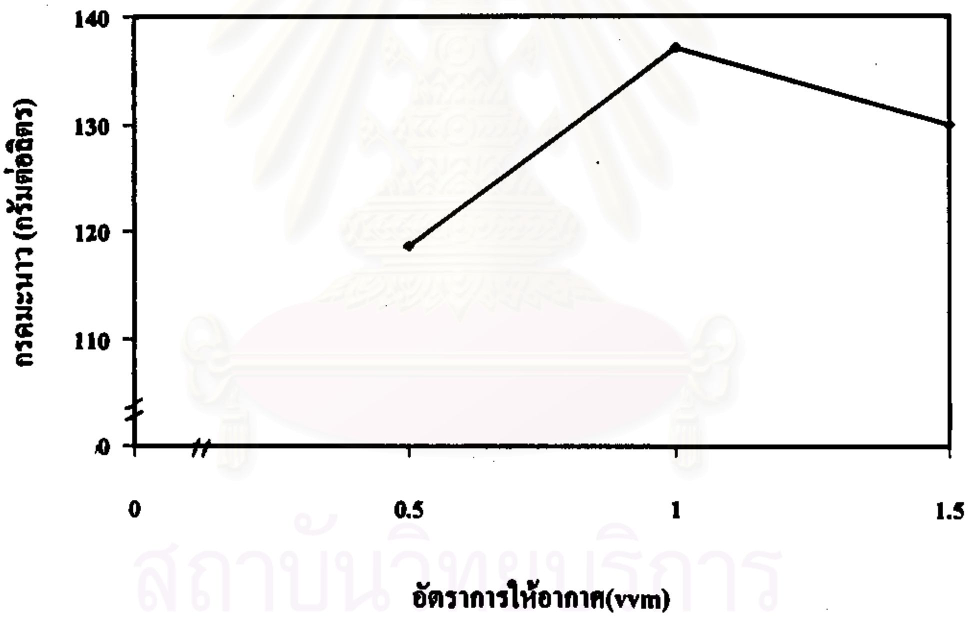
2.4 ผลการผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 5 ลิตรโดยใช้เซลล์ตรึงขนาดเล็ก

จากการนำเอาสารละลายผสมของโซเดียมอัลจิเนตกับเซลล์ยีสต์ลงไปปั่นในน้ำมันถั่วเหลืองที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยความเร็วสูง ๆ จะทำให้ได้เม็ดเซลล์ตรึงมีขนาดเล็กคือมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5-1.0 มิลลิเมตร Nilsson และคณะ (1983) ได้รายงานว่าการใช้น้ำมันถั่วเหลืองเป็นสารตัวกลางทำให้ได้เซลล์ตรึงมีรูปร่างกลมและมีขนาดเล็ก เมื่อนำเอาเซลล์ตรึงไปผลิตกรดมะนาวในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตกรดมะนาวพบว่า สามารถให้ผลผลิตกรดมะนาวได้เร็ว ผลผลิตกรดมะนาว 134.09 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 4 หรือชั่วโมงที่ 96 ของการหมัก อัตราภาพรลิตกรดมะนาว 1.65 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ซึ่งสอดคล้องกับ ประเสริฐ หาญเมืองใจ (2537) ที่ผลิตกรดมะนาวจากเซลล์อิสระของ *C. oleophila* C-73 ให้ผลผลิตกรดมะนาวสูงสุดในชั่วโมงที่ 96 ของการหมักเช่นกัน แสดงให้เห็นว่าเซลล์ตรึงมีขนาดเล็กจะมีจำนวนเม็ดเซลล์ตรึงมีจำนวนมากกว่าเม็ดเซลล์ตรึงที่มีขนาดใหญ่เมื่อใช้จำนวนเซลล์ตรึงเริ่มต้น 15 กรัมเม็ดเซลล์ตรึงต่อลิตรเท่ากัน ทำให้มีพื้นผิวสัมผัสรวมมากกว่าจึงมีพื้นที่สัมผัสกับอาหารและออกซิเจนได้มากกว่าเซลล์ตรึงที่มีขนาดใหญ่ และมีระยะของตัวจุลินทรีย์กับสารอาหารสั้นกว่าเซลล์ตรึงที่มีขนาดใหญ่ทำให้ *C. oleophila* C-73 เปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสไปเป็นกรดมะนาวได้เร็วขึ้นและเซลล์ตรึงขนาดเล็กจะมีพื้นที่ผิวสัมผัสกับสารอาหารและออกซิเจนได้มากกว่าเซลล์ตรึงที่มีขนาดใหญ่ Horitsu และคณะ (1988) Kautola และคณะ (1991) รายงานว่าเมื่อลดขนาดของเซลล์ตรึงจะทำให้อัตราการผลิตกรดมะนาวได้เร็วขึ้น

2.5 ผลของการแปรผันอัตราการให้อากาศ

การผลิตกรดมะนาวโดยยีสต์เป็นการหมักในสภาวะที่ต้องการอากาศ (Briffaud และ Engasser, 1979). ออกซิเจนจะไปทำปฏิกิริยาออกซิเดชั่นให้กลูโคสเปลี่ยนไปเป็นกรดมะนาว (Rane และ Sims, 1994) การผลิตกรดมะนาวจะได้สูงสุด เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีการให้ออกซิเจนอย่างเพียงพอ นอกจากการกวนอาหารเลี้ยงเชื้อแล้ว การให้อากาศเข้าไปโดยตรงก็เป็นวิธีการหนึ่งในการเพิ่มออกซิเจนลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ ยีสต์ต้องการออกซิเจนเพิ่มมากขึ้นในช่วงการเจริญเติบโตและช่วงที่มีการผลิตกรดมะนาว (production phase) เมื่อให้อากาศเข้าไปในถังหมัก 0.5, 1.0, 1.5 vvm เมื่อเพิ่มปริมาณการให้อากาศปริมาณเซลล์อิสระในน้ำหมักเพิ่มมากขึ้นแสดงว่าอัตราการเจริญเพิ่มมากขึ้น พบว่าเมื่อทำการควบคุมการให้อากาศ 0.5 vvm ผลผลิตกรดมะนาวจะต่ำ คือ 118.84 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 96 ของการหมัก อัตราการผลิตกรดมะนาว 1.90 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง เมื่อการให้อากาศเป็น 1.0 vvm ผลผลิตกรดมะนาวสูงสุดเท่ากับ 137.07 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 96 ของการหมัก อัตรากาผลิตกรดมะนาว 2.25 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และเมื่อเพิ่มอัตราการให้อากาศเป็น 1.5 vvm ผลผลิตกรดมะนาวสูงสุดเท่ากับ 130.84 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 96 ของการหมัก อัตราการผลิตกรดมะนาว 2.05 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง จะมากว่าเมื่อให้อากาศ 1 vvm จะผลิตกรดมะนาวได้สูงกว่า(แสดงดังรูป 11) สอดคล้องกับรายงานของ Crueger และCrueger(1990) อัตราการให้อากาศของการผลิตกรดมะนาวในถังหมักในระยะการผลิตกรด (Acid production phase) จะต้องการอากาศ 0.5-1 vvm จากรายงานของ Rane และ Sims (1994) ผลผลิตกรดมะนาวเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มการละลายออกซิเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ และเมื่อปริมาณเซลล์เพิ่มขึ้นจะมีผลทำให้ผลผลิตกรดมะนาวลดลงเพราะกลูโคสจะถูกนำไปใช้ในการเจริญเติบโตมากกว่าการผลิตกรดมะนาวในทางกลับกันถ้าผลผลิตกรดมะนาวเพิ่มมากขึ้นจะสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์ Dawson และ Maddox (1987)

รายงานว่าผลผลิตกรดมะนาวจาก *A. niger* เพิ่มขึ้นจากร้อยละ 41 ถึงร้อยละ 60 เมื่อความเข้มข้นของการละลายออกซิเจนเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 25 ถึงร้อยละ 75 จากรายงานของ Horitsu และคณะ (1988) และ Chung และ Chang (1988) การให้ออกซิเจนบริสุทธิ์เข้าไปในถังหมักทำให้ผลผลิตกรดมะนาวเพิ่มขึ้น แต่การให้ออกซิเจนบริสุทธิ์จะทำให้เกิดฟองมาก Rane และ Sims (1994) รายงานว่าการผลิตกรดมะนาวจากยีสต์มีข้อเสียคือจะมีการผลิตกรดไอโซซิตริกด้วยระหว่างการผลิตกรดมะนาวซึ่งมีผลให้ผลผลิตกรดมะนาวลดลง Okoshi และคณะ (อ้างถึงใน Rane และ Sims 1994) พบว่ากรดไอโซซิตริกลดลงเมื่อเพิ่มการละลายของออกซิเจน



รูปที่ 11 เปรียบเทียบอัตราการให้อากาศเมื่อทำการหมักกรดมะนาวจากเซลล์ตรึง *C. oleophila* C-73 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

3. ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ

การผลิตกรดมะนาวจากเซลล์ตรึง *C. oleophila* C-73 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ปัจจัย ที่สำคัญอีกอย่างหนึ่งคือการควบคุมค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตกรดมะนาว

ให้คงที่ ซึ่งค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะของเชื้อ *C. oleophila* C-73 คือ pH 6.4 การควบคุมค่าความเป็นกรดด่างของอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวโดยทั่วไปใช้แคลเซียมคาร์บอเนตเติมลงไปตั้งแต่เริ่มต้นของการหมักเพื่อเป็นตัวสะเทิน (Neutralizer) กรดมะนาวที่เกิดขึ้นระหว่างการหมัก โดยอาศัยสมบัติทางเคมีเกี่ยวกับการละลายของแคลเซียมคาร์บอเนต ปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตที่เหมาะสมของ *C. oleophila* C-73 คือร้อยละ 10 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เมื่อเพิ่มสูงมากกว่านี้พบว่าการผลิตกรดมะนาวและการเติบโตจะลดลง (เรวดี เลิศไตรรักษ์, 2535) ซึ่งจากรายงานของประเสริฐ หาญเมืองใจ (2537) ปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตที่เหมาะสมของการผลิตกรดมะนาวจากเซลล์อิสระ *C. oleophila* C-73 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร คือ 120 กรัมต่อลิตร ในขณะที่ ภรณี ลิตปีสุต (2538) รายงานว่าการผลิตกรดมะนาวจากเซลล์ตรึง *C. oleophila* C-73 ในระดับขวดเขย่าปริมาณแคลเซียมเกรดอุตสาหกรรมที่เหมาะสมคือ 100 กรัมต่อลิตร ปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้คือ 98.79 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 8 ของการหมัก เมื่อใช้ปริมาณเพิ่มขึ้นเป็น 120 และ 140 กรัมต่อลิตร ปริมาณกรดมะนาวที่ได้มีค่าลดลง ในการทดลองนี้จึงใช้แคลเซียมคาร์บอเนต 100 กรัมต่อลิตร นอกจากการใช้แคลเซียมคาร์บอเนตแล้วยังมีรายงานการใช้ด่างแก่บางชนิด เช่น สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซน์ (Nakanishi *et al.*, 1972, Wejtatowicz *et al.*, 1991) และการใช้แคลเซียมไฮดรอกไซด์ ในการควบคุมค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตกรดมะนาว

จากการทดลองเมื่อทำการแบ่งเติมปริมาณแคลเซียม คาร์บอเนตโดยเติมตั้งแต่เริ่มต้นปริมาณ 35 กรัมต่อลิตร แล้วทำการเติมลงในถังหมักทุก ๆ 24 ชั่วโมงในอัตรา 15 กรัมต่อลิตร พบว่าผลผลิตกรดมะนาว 140.19 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 96 ของการหมัก อัตราการผลิตกรดมะนาว 2.78 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ผลผลิตกรดมะนาวที่ได้เทียบกับปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ถูกใช้ไปเท่ากับร้อยละ 64.49 ค่าความหนืดของน้ำหมักเท่ากับ 3872 เซ็นติพอยซ์ น้ำหมักมีค่าความหนืดสูง เมื่อเปลี่ยน

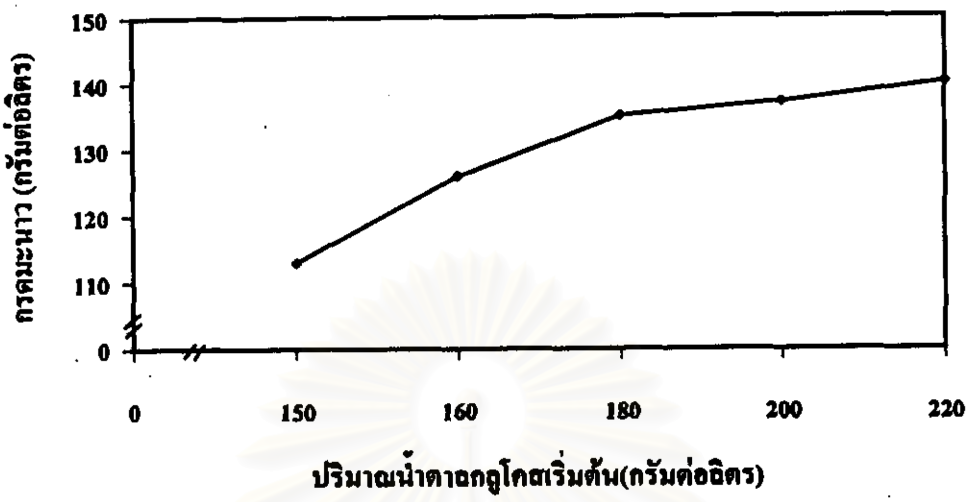
การควบคุมค่าความเป็นกรดด่างด้วยแคลเซียมคาร์บอเนตเริ่มต้น 50 กรัมต่อลิตรร่วมกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 3.0 โมลาร์ โดยเติมแคลเซียมคาร์บอเนตตั้งแต่เริ่มต้น 50 กรัมต่อลิตร แล้วทำการเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ระหว่างการหมัก พบว่าอัตราการผลิตกรดมะนาวต่ำ คือ 1.8 กรัม ต่อลิตรต่อชั่วโมง ผลผลิตกรดมะนาว 117.28 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 96 ของการหมัก ผลผลิตกรดมะนาวเปรียบเทียบกับน้ำตาลกลูโคสที่ถูกใช้เท่ากับร้อยละ 55.25 ค่าความหนืดของน้ำหมัก 925 เซ็นติพอยซ์ น้ำหมักจะหนืดน้อยกว่าการใช้แคลเซียมคาร์บอเนตอาจผลเนื่องมาจากการเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ทำให้น้ำหมักเจือจางและกรดมะนาวที่สะสมระหว่างการหมักจะอยู่ในรูปของเกลือโซเดียมซิเตรทซึ่งละลายในน้ำได้ โซเดียมไอออนที่อยู่ในน้ำหมักจะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์หลายชนิด และทำให้โปรตีนเสียสภาพไปด้วย (Maiorella *et al.*, 1984) ส่วนผลของการควบคุมค่าความเป็นกรดด่างของน้ำหมักด้วยแคลเซียมออกไซด์ พบว่าผลผลิตกรดมะนาวที่ได้จะต่ำ คือ 98.50 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 96 ของการหมัก อัตราการผลิตกรดมะนาว 1.4 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ผลผลิตกรดมะนาวที่ได้เปรียบเทียบกับปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ถูกใช้ไปคือร้อยละ 50 ค่าความหนืดของน้ำหมัก 650 เซ็นติพอยซ์ น้ำหมักมีความข้นไม่มากเปรียบเทียบกับควบคุมค่าความเป็นกรดด่างด้วยแคลเซียมคาร์บอเนตและแคลเซียมคาร์บอเนตร่วมกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ผลผลิตกรดมะนาวเมื่อทำการควบคุมค่าความเป็นกรดด่างด้วยแคลเซียมออกไซด์มีค่าต่ำ สาเหตุอาจจะเนื่องมาจากต้องใช้สารละลายแคลเซียมออกไซด์เข้มข้นร้อยละ 40 ในปริมาณมากและตลอดเวลา ไม่สามารถที่จะเติมลงไปตั้งแต่เริ่มต้นได้เนื่องจากแคลเซียมออกไซด์มีค่าความเป็นด่างสูง และในการเติมแคลเซียมออกไซด์ตลอดเวลาทำให้น้ำหมักเจือจางลงมาก เมื่อเปรียบเทียบค่าความหนืดแคลเซียมออกไซด์จึงเหมาะสมที่จะสำหรับในการควบคุมค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตกรดมะนาวในระดับขยายส่วนเนื่องจากค่าความหนืดต่ำจึง

ใช้พลังงานการกวนและการให้อากาศต่ำ จากรายงานของ Chung และ Chang (1988) กระบวนการหมักในระดับอุตสาหกรรมจะต้องใช้พลังงานสูงในการกวนและการให้อากาศ เมื่อเปรียบเทียบราคาระหว่างแคลเซียมคาร์บอเนตและแคลเซียมออกไซด์ ราคาของแคลเซียมออกไซด์ถูกกว่าแคลเซียมคาร์บอเนตประมาณ 5 เท่าและปริมาณแคลเซียมออกไซด์ที่ใช้จะน้อยกว่า คือจะใช้แคลเซียมออกไซด์ 66 กรัมต่อลิตร ในขณะที่แคลเซียมคาร์บอเนตจะใช้ถึง 100 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้การใช้แคลเซียมคาร์บอเนตสูง ๆ นี้ทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีลักษณะขุ่นข้น (Muddied culture) และกรดมะนาวที่เกิดขึ้นระหว่างการหมักจะรวมตัวกับแคลเซียมคาร์บอเนตได้สารแคลเซียมซิเตรต ($C_6H_5O_7Ca$) ในน้ำหมักมีผลทำให้น้ำหมักหนืดข้นเพิ่มมากขึ้นตามปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตเพิ่มมากขึ้น และปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตที่ใช้มีผลให้ประสิทธิภาพการแลกเปลี่ยนออกซิเจนระหว่างอากาศกับอาหารเลี้ยงเชื้อ (dissolve oxygen) ลดลง (Furukawa *et al.*, 1977) อาจเป็นสาเหตุทำให้ปริมาณการผลิตกรดมะนาวลดลงด้วย เมื่อเปรียบเทียบการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตทั้งหมดตั้งแต่เริ่มต้นกับการแบ่งเติมแคลเซียมคาร์บอเนตพบว่าการแบ่งเติมเหมาะสำหรับการผลิตกรดมะนาวจากเซลล์ตรึงมากกว่าเนื่องจากเมื่อเติมลงไปครั้งเดียวหมดทำให้น้ำหมักข้นมาก ส่วนการแบ่งเติมน้ำหมักจะค่อย ๆ ข้นขึ้นในวันหลัง ๆ ของการเติม ซึ่งประสิทธิภาพการแลกเปลี่ยนออกซิเจนและอาหารเลี้ยงเชื้อจึงดีกว่า

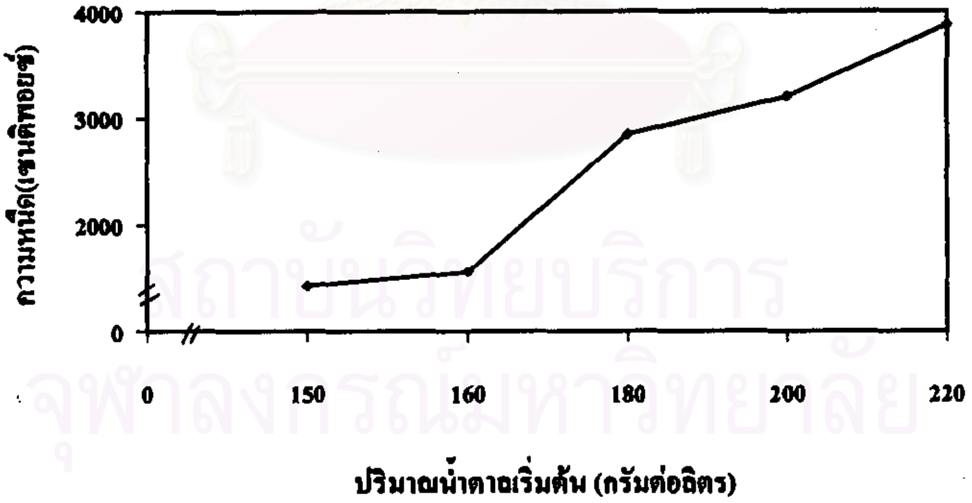
4. ปริมาณกลูโคสเริ่มต้นที่เหมาะสม

การเลี้ยงเซลล์ตรึงในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตกรดมะนาวที่มีปริมาณน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตกรดมะนาว 150, 160, 180, 200 และ 220 กรัมต่อลิตร พบว่าปริมาณน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นเพิ่มสูงขึ้น การผลิตกรดมะนาวเพิ่มมากขึ้น ผลผลิตกรดมะนาว 113.26, 126.94, 135.00, 137.05 และ 140.19 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 96 ของการหมักตามลำดับ อัตราการ

ผลิตกรดมะนาว 1.75, 1.70, 1.80, 2.30 และ 2.00 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ เมื่อคิดผลผลิตกรดมะนาวที่ได้กับปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ถูกใช้ไปเท่ากับ 75, 78, 75, 72 และ 64 ตามลำดับ เมื่อใช้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น 150, 160 กรัมต่อลิตร พบว่าปริมาณน้ำตาลกลูโคสถูกใช้ไปหมดตั้งแต่ชั่วโมงที่ 84 ของการหมัก เมื่อใช้น้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น 180 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 84 น้ำตาลถูกใช้ไปเกือบหมด จะพบว่าเมื่อปริมาณน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นเพิ่มขึ้นผลผลิตกรดมะนาวจะเพิ่มมากขึ้น (แสดงดังรูปที่ 12) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Kim และ Roberts (1991) อัตราการผลิตกรดมะนาวเพิ่มมากขึ้นเมื่อความเข้มข้นของกลูโคสสูงขึ้น แต่อัตราการใช้กลูโคสจะมีค่าคงที่ Rane และ Sims (1994) รายงานว่าผลผลิตและอัตราการผลิตกรดมะนาวขึ้นอยู่กับปริมาณน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตกรดมะนาว เมื่อเปรียบเทียบความหนืดของน้ำหมักพบว่าความหนืดจะเพิ่มมากขึ้นตามปริมาณน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นและปริมาณกรดมะนาวที่เพิ่มมากขึ้น ผลของความหนืดของน้ำหมักวัดค่าที่ชั่วโมงที่ 96 ของการหมัก คือ 1425, 1550, 2850, 3100 และ 3872 เซนติพอยส์ ตามลำดับ ซึ่งพบว่าค่าความหนืดจะเพิ่มมากขึ้นตามปริมาณน้ำตาลกลูโคสเพิ่มสูงขึ้น(แสดงดังรูปที่ 13) การที่น้ำหมักมีความหนืดสูง ๆ การถ่ายเทความร้อนในถังหมักไม่ดีมีผลทำให้ต้องใช้พลังงานในการหล่อเย็นในถังหมักเพิ่มมากขึ้น อาจมีผลทำให้เซลล์ตรึงได้รับสารอาหารและออกซิเจนไม่เพียงพอ ทำให้อัตราการผลิตกรดมะนาวลดลง สอดคล้องกับรายงานของประเสริฐ หาญเมืองใจ (2537) ปริมาณน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น 250 กรัมต่อลิตร ไม่เหมาะสำหรับผลิตกรดมะนาวจากเซลล์อิสระของ *C. oleophila* C-73 เนื่องจากปริมาณน้ำตาลสูงจะทำให้ผลิตกรดมะนาวออกมากจะยับยั้งการเจริญและความหนืดของน้ำหมักเพิ่มมากขึ้นทำให้การถ่ายเทมวลและอากาศภายในถังหมักทำได้ยากจึงไม่เหมาะสม นอกจากนี้ยังพบว่าการเจริญของเชื้อช้าลง Shah และคณะ(1993) รายงานว่าน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ ที่มีสมบูรณ์เดกซ์โตรสร้อยละ 96



รูปที่ 12 เปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นในการหมักกรดมะนาวจากเซลล์ตรึง *C. oleophila* C-73 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร



รูปที่ 13 เปรียบเทียบค่าความหนืดจากการหมักกรดมะนาวของเซลล์ตรึง *C. oleophila* C-73 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่ใช้ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น 150, 160, 180, 200 และ 220 กรัมต่อลิตร

เหมาะสำหรับผลิตกรดมะนาวจากยีสต์ *Y. lipolytica* (DS-1) ปริมาณน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นที่เหมาะสมคือ 200 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น 300 กรัมต่อลิตรอัตราการผลิตกรดมะนาวช้าลง Rymowicz และคณะ(1993) รายงานว่าการผลิตกรดมะนาวจากเซลล์ตรึง *Y. lipolytica* ปริมาณน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นที่เหมาะสมคือ 150 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้น้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น 208 กรัมต่อลิตรพบว่าผลผลิตลดลง Xu และคณะ (1989) ได้รายงานว่าปริมาณน้ำตาลซูโครสเริ่มต้นที่เหมาะสมกับการผลิตกรดมะนาวจากเซลล์อิสระ *A. niger* คือร้อยละ 7.5 และจะไม่มีการผลิตกรดมะนาวถ้าในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตกรดมะนาวมีน้ำตาลน้อยกว่าร้อยละ 2.5 ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Rane และ Sims (1994) ถ้าปริมาณน้ำตาลกลูโคสต่ำ น้ำตาลกลูโคสจะถูกนำไปใช้ในการเจริญและรักษาสภาพของเซลล์จึงทำให้ผลผลิตกรดมะนาวต่ำ Eikmeier และ Rehm (1984) พบว่าการผลิตกรดมะนาวจากเซลล์ตรึง *A. niger* ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวที่มีปริมาณน้ำตาลซูโครสเริ่มต้นร้อยละ 26 ได้ผลผลิตกรดมะนาว 42.7 กรัมต่อลิตร ในถังหมักแบบแอร์ลิฟ หลังจากการหมัก 25 วัน Honecker และคณะ (1989) รายงานว่าการผลิตกรดมะนาวจากเซลล์ตรึง *A. niger* ต้องการน้ำตาลซูโครสเริ่มต้นต่ำกว่าการผลิตกรดมะนาวจากเซลล์อิสระ ปริมาณน้ำตาลซูโครสเริ่มต้นสูงจะทำให้มีการผลิตสารพวกโพลิออล (glycerol, erythritol และ arobitol)

สรุปผลการทดลอง

1. อัตราการกวนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับผลิตกรดมะนาวจากเซลล์ตรึง *C. oleophila* C-73 ในถังหมักขนาด 5 ลิตรคือ 600 รอบต่อนาที
2. อัตราการกวนอาหารเพิ่มขึ้นเกิน 600 รอบต่อนาที จะทำให้ผลผลิตกรดมะนาวลดลงเนื่องจากอัตราการกวนสูงมากเกินไปทำเกิดการหมุนวนของอาหารเลี้ยงเชื้อมากมีผลทำให้เกิดแรงเค้น (shear

stress) เพิ่มมากขึ้นทำให้เป็นอันตรายต่อเซลล์จุลินทรีย์ ทำให้ยีสต์ผลิตกรดมะนาวลดลง และที่อัตราการกวนอาหารเลี้ยงเชื้อสูงๆจะทำให้เม็ดเซลล์ตรึงแตกบางส่วน

3. จำนวนเซลล์ตรึงเริ่มต้นที่เหมาะสมคือ 15 กรัมเม็ดเซลล์ตรึงต่อลิตรขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของเม็ดเซลล์ตรึงที่เหมาะสมเท่ากับ 0.5-1.0 มิลลิเมตร
4. เซลล์ตรึงที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางลดลง มีผลทำให้เซลล์ตรึงมีพื้นที่สัมผัสสารอาหารและออกซิเจนเพิ่มมากขึ้น ระยะห่างระหว่างเซลล์จุลินทรีย์กับสารอาหารลดลง มีผลทำให้การผลิตกรดมะนาวเพิ่มมากขึ้นและระยะเวลาในการผลิตเร็วขึ้น
5. ปริมาณเซลล์ตรึงเริ่มต้น 15 และ 30 กรัมเม็ดเซลล์ตรึงต่อลิตร พบว่าผลผลิตกรดมะนาวที่ได้มีค่าใกล้เคียงกัน เนื่องจากจำนวนเซลล์เพิ่มมากขึ้นกลูโคสจะถูกนำไปใช้ในการเจริญมากกว่าการผลิตกรดมะนาว
6. อัตราการให้อากาศที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาวจากเซลล์ตรึง *C. oleophila* C-73 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร คือ 1 vvm
7. การผลิตกรดมะนาวจากยีสต์เมื่อปริมาณออกซิเจนเพิ่มมากขึ้นอัตราการผลิตกรดมะนาวก็จะเพิ่มมากขึ้นด้วย
8. การผลิตกรดมะนาวจาก *C. oleophila* C-73 โดยการหมักแบบ fed-batch fermentation ที่มีการเติมน้ำตาลกลูโคสเข้าไปในถังหมักในระหว่างการหมักจะให้ผลผลิตกรดมะนาวสูงกว่าและระยะเวลาในการหมักเร็วกว่าการหมักแบบ batch fermentation
9. เมื่อควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำหมักด้วยแคลเซียมคาร์บอเนต 100 กรัมต่อลิตรจะให้ผลผลิตกรดมะนาวสูงสุด แต่มีค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำหมักลดลงจนถึง 4 น้ำหมักมีความหนืด

สูงทำให้ประสิทธิภาพในการกวนและการแลกเปลี่ยนออกซิเจนลดลง และการควบคุมอุณหภูมิในการหมักยากยิ่งขึ้น

10. ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อทำการหมักโดยยีสต์มีค่าต่ำกว่า 4.5 จะทำให้ผลผลิตกรดมะนาวลดลง เนื่องจากเซลล์ยีสต์ไม่สามารถทนค่าความเป็นกรด-ด่างที่มีค่าต่ำได้
11. การควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำหมักด้วยการแบ่งเติมแคลเซียมคาร์บอเนต จะให้ผลผลิตกรดมะนาวสูงกว่าการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตลงไปครั้งเดียวตั้งแต่เริ่มต้นของการหมัก
12. การควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำหมักด้วยการแบ่งเติมแคลเซียมออกไซด์ ผลผลิตกรดมะนาวลดลงประมาณร้อยละ 14 แต่ค่าความหนืดของน้ำหมักลดลงด้วยเช่นกันซึ่งทำให้การกวนสารอาหารและอาถ่ายเทมวลในถังหมักดีขึ้น ดังนั้นแคลเซียมออกไซด์จึงเหมาะที่จะนำควบคุมค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อในการผลิตกรดมะนาวในระดับขยายส่วนเนื่องจากแคลเซียมออกไซด์มีราคาถูกกว่าแคลเซียมคาร์บอเนต 5 เท่าและปริมาณแคลเซียมออกไซด์ที่ใช้ 66 กรัมต่อลิตรซึ่งน้อยกว่าการใช้แคลเซียมคาร์บอเนตซึ่งใช้ปริมาณ 100 กรัมต่อลิตร
13. ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตกรดมะนาวเพิ่มมากขึ้น ปริมาณกรดมะนาวที่ได้มีค่าเพิ่มขึ้นแต่เมื่อปริมาณน้ำตาลกลูโคสสูงขึ้นค่าความหนืดของน้ำหมักก็เพิ่มมากขึ้นเช่นกัน
14. ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหมาะสมในการผลิตกรดมะนาวจากเซลล์ตรึง *C. oleophila* C-73 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร คือ 200 กรัมต่อลิตร
15. ภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดมะนาวจากเซลล์ตรึง *C. oleophila* C-73 ในถังหมักขนาด 5 ลิตรคือ จำนวนเซลล์ตรึงเริ่มต้น 15 กรัมเม็ดเซลล์ตรึงต่อลิตร ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเม็ดเซลล์ตรึงเท่ากับ 0.5-1.0 มิลลิเมตร ปริมาณน้ำตาลกลูโคส 200 กรัมต่อลิตร อัตราการให้อากาศ 1 vvm

อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที ควบคุมการหมักที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส จะให้ผลผลิตกรดมะนาวสูงสุด 137.07 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่96 ของการหมัก

16. การผลิตกรดมะนาวจาก *C. oleophila* C-73 จากเซลล์ตรึงและเซลล์อิสระ ในถังหมักขนาด 5 ลิตร จะให้ผลผลิตกรดมะนาวใกล้เคียงกัน ใช้ระยะเวลาในการหมัก 96 แต่การผลิตกรดมะนาวจากเซลล์ตรึงมีข้อดีคือสามารถนำเซลล์กลับมาใช้ในการผลิตกรดมะนาวได้หลายครั้ง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย