บทที่ 4

วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

การศึกษาลักษณะการเจริญของเชื้อ *C. oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับการเจริญเติบโต

การเลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับการเจริญเติบโต พบว่าเชื้อเริ่มเข้าสู่การเจริญระยะทวีคูณตั้งแต่ชั่วโมงที่ 3 และเข้าสู่ช่วงปลายของระยะทวีคูณในชั่วโมงที่ 21 และเข้าสู่การเจริญระยะคงที่ในเวลาต่อมา งานวิจัยนี้จึงได้เลือกยีสต์ที่เลี้ยงในอาหารสำหรับการเจริญชั่วโมงที่ 15 ซึ่งเป็นช่วงกลางของระยะทวีคูณ เซลล์ในช่วงนี้มีลักษณะแข็งแรง มีกิจกรรม (acitvity) ภายในเซลล์สูงสุด เหมาะสำหรับใช้เป็นหัวเชื้อเพื่อการผลิตผลิตภัณฑ์ (วราวุฒิ,2529) จากนั้นจึงตรึงเซลล์ยีสต์กับสารพาหะแล้วนำเซลล์ตรึงมาผลิตกรดมะนาว

การคัดเลือกสารพาหะที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการตรึงเซลล์ *C. oleophila* C-73 เพื่อผลิตกรดมะนาว

การตรึงเซลล์กระทำโดยวิธีกักขัง ซึ่งเป็นวิธีการที่ง่าย เซลล์ได้รับความกระทบกระเทือนน้อย เป็นวิธีที่ได้รับความนิยมและประสบความสำเร็จมาก (Chibata et al., 1978) ได้เลือกใช้สารพาหะในการตรึงเซลล์ 3 ชนิด คือ แคลเซียมอัลจิเนต แคปปา-คาร์ราจิแนนและเจลลาติน โดยพิจารณาจากความสามารถในการผลิตกรดมะนาวได้ปริมาณสูงสุดเป็นหลัก หลังการทดลองตรึงเซลล์ด้วยเจลลาติน พบว่าไม่สามารถนำมาใช้ในการผลิตกรดมะนาวได้ เนื่องจากเจลลาตินละลายทันทีในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาว ทั้งนี้อาจเกิดจากคุณสมบัติของเจลลาตินที่ไม่เสถียรและสามารถแปรผันกลับได้ตามอุณหภูมิ

เมื่อใช้แคลเซียมอัลจิเนตเป็นสารพาหะในการตรึงเซลล์ เซลล์ตรึงผลิตกรดมะนาวได้ในอัตราที่ช้ากว่าเซลล์ตรึงที่ใช้แคปปา-คาร์ราจิแนนเป็นสารพาหะ คือ ประมาณ 22.08 และ 24.00 กรัมต่อลิตรต่อวัน ตามลำดับ แต่ปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้สูงสุดเมื่อ

ใช้แคลเซียมอัลจิเนตเป็นสารพาหะสูงกว่าการใช้แคปปา-คาร์ราจิแนนเป็นสารพาหะเท่ากับ 135.87 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 8 ของการหมัก และ 115.98 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 7 ของการหมัก ตามลำดับ ประกอบกับขั้นตอนการเตรียมเซลล์ตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนตง่าย สะดวกและรวดเร็ว อีกทั้งราคาของโซเดียมอัลจิเนต (346 บาทต่อ 100 กรัม) ต่ำกว่าแคปปา-คาร์ราจิแนน (4,211 บาทต่อ 100 กรัม) งานวิจัยนี้เลือกแคลเซียมอัลจิเนตเป็นสารพาหะที่เหมาะสมสำหรับการตรึงเซลล์ *C. oleophila* C-73 เพื่อผลิตกรดมะนาว ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Horitsu และคณะ (1988) ที่พบว่าการใช้แคลเซียมอัลจิเนตเป็นสารพาหะในการตรึงเซลล์ *A. niger* G-011 ให้ปริมาณกรดมะนาวสูงกว่าการใช้แคปปา-คาร์ราจิแนนเป็นสารพาหะ นอกจากนี้มีงานวิจัยของ Kautola และคณะ (1991) พบว่าการใช้แคลเซียมอัลจิเนตเป็นสารพาหะสำหรับการตรึงเซลล์ *Y. lipolytica* ในการผลิตกรดมะนาว ให้ปริมาณกรดมะนาวสูงกว่าการใช้แคปปา-คาร์ราจิแนนเป็นสารพาหะในการตรึงเซลล์

<u>การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเซลล์ *C. oleophila* C-73 เพื่อผลิตกรดมะนาว</u>

1. <u>ความเข้มข้นของแคลเซียมอัลจิเนตที่เหมาะสม</u>

เมื่อความเข้มข้นของแคลเซียมอัลจิเนตที่ใช้เป็นสารพาหะในการตรึงเซลล์เพิ่มขึ้นเท่ากับ 2, 3 และ 4 เปอร์เซนต์ ทำให้ปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้สูงสุดเพิ่มขึ้นเท่ากับ 111.91, 126.30 และ 135.87 กรัมต่อลิตรตามลำดับ ในวันที่ 8 ของการหมัก เนื่องจากการเพิ่มความเข้มข้นของแคลเซียมอัลจิเนต เป็นการปรับปรุงคุณสมบัติของเม็ดเจลให้มีความแข็งแรง (gel strength) สูงขึ้น แต่ขนาดรูพรุน (pore size) ของเม็ดเจลลดลง (Cheethem et al.,1979) ดังนั้นที่ความเข้มข้นของแคลเซียมอัลจิเนตเท่ากับ 4 เปอร์เซนต์ โครงสร้างของเม็ดเจลมีความแข็งแรงมากกว่า ขนาดของรูพรุนเล็กกว่าที่ความเข้มข้นของแคลเซียมอัลจิเนต 2 และ 3 เปอร์เซนต์ โอกาสที่เซลล์เจริญและหลุดออกมาจากเซลล์ตรึงน้อย ทำให้ความสามารถของเซลล์ตรึงต่อการผลิตกรดมะนาวเพิ่มขึ้น เช่นเดียวกับ Rymowicz และคณะ (1993) พบว่าเมื่อความเข้มข้นของแคลเซียมอัลจิเนตที่ใช้ในการตรึงเซลล์ *Y.lipolytica* เท่ากับ 2 เปอร์เซนต์ ปริมาณกรดมะนาว

ที่ผลิตได้สูงกว่าเมื่อใช้ความเข้มข้นของแคลเซียมอัลจิเนตเท่ากับ 1 เปอร์เซนต์ แต่จากการทดลองเมื่อใช้เซลล์ตรึงที่มีความเข้มข้นของแคลเซียมอัลจิเนต 5 เปอร์เซนต์ อัตราการผลิตกรดมะนาวประมาณ 17.28 กรัมต่อลิตรต่อวัน ช้ากว่าเมื่อใช้ความเข้มข้นของแคลเซียมอัลจิเนตเท่ากับ 2, 3 และ 4 เปอร์เซนต์ ที่มีอัตราการผลิตกรดมะนาวใกล้เคียงกันประมาณ 22.08 กรัมต่อลิตรต่อวัน และปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้สูงสุดเท่ากับ 118.13 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 9 ของการหมัก อาจเนื่องจากรูพรุนของเม็ดเจลที่เล็กลงมาก ทำให้การแพร่ผ่านของสารอาหารยาก ดังนั้นความเข้มข้นของแคลเซียมอัลจิเนตที่ 4 เปอร์เซนต์จึงเหมาะสม สำหรับเตรียมเซลล์ตรึงเพื่อผลิตกรดมะนาว

2. <u>อัตราส่วนของเซลล์ต่อแคลเซียมอัลจิเนตที่เหมาะสม</u>

การผลิตกรดมะนาวของเซลล์ตรึงที่เตรียมได้ โดยใช้อัตราส่วนของเซลล์ต่อแคลเซียมอัลจิเนตที่ต่างกัน ทำให้ความหนาแน่นของเซลล์ในเซลล์ตรึงต่างกัน มีผลทำให้เวลาในการผลิตให้ได้ปริมาณกรดมะนาวสูงสุดและปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้สูงสุดมีค่าแตกต่างกันเล็กน้อย คือ เมื่อใช้อัตราส่วนของเซลล์ต่อแคลเซียมอัลจิเนตเท่ากับ 1:15, 1:25, 1:35 และ 1:45 ปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้สูงสุดเท่ากับ 131.02, 135.60 ในวันที่ 8 ของการหมัก และ 136.56, 129.99 ในวันที่ 9 ของการหมัก ตามลำดับ เนื่องจากขนาดของรูพรุนและความแข็งแรงของเซลล์ตรึงที่เท่ากัน เมื่อความเข้มข้นของแคลเซียมอัลจิเนตเท่ากัน (Cheethem et al.,1979) นอกจากนี้อัตราเร็วในการผลิตกรดมะนาวมีค่าใกล้เคียงกันประมาณ 22.56 กรัมต่อลิตรต่อวัน ดังนั้นเพื่อให้ได้ปริมาณกรดมะนาวสูง ลดเวลาในการหมักและประหยัดสารพาหะที่ใช้ จึงเลือกอัตราส่วนของเซลล์ต่อแคลเซียมอัลจิเนตเท่ากับ 1:25 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ในการเตรียมเซลล์ตรึงเพื่อผลิตกรดมะนาว เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Rymowicz และคณะ(1993) ที่แปรผันความหนาแน่นของเซลล์ในเซลล์ตรึง เลือกอัตราส่วนของเซลล์ต่อแคลเซียมอัลจิเนตที่ให้ปริมาณกรดมะนาวสูง

3. <u>ขนาดของเซลล์ตรึงที่เหมาะสม</u>

เซลล์ตรึงขนาดเล็กที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 0.369 และ 0.441

เซนติเมตร ผลิตกรดมะนาวได้สูงสุดเท่ากับ 136.84 และ 135.60 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 8 ของการหมัก ตามลำดับ มีอัตราการผลิตกรดมะนาวใกล้เคียงกันประมาณ 22.08 กรัมต่อลิตรต่อวัน ในขณะที่เซลล์ตรึงขนาดใหญ่ซึ่งมีเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 0.570 เซนติเมตร ผลิตกรดมะนาวสูงสุดเท่ากับ 131.94 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 10 ของการหมักและมีอัตราการผลิตกรดมะนาวประมาณ 16.56 กรัมต่อลิตรต่อวัน แสดงให้เห็นว่าเซลล์ตรึงขนาดเล็กผลิตกรดมะนาวได้สูงและเร็วกว่าเซลล์ตรึงที่มีขนาดใหญ่ เนื่องจากพื้นผิวสัมผัสของเซลล์ตรึงกับสารอาหารมีมากกว่าเซลล์ตรึงขนาดใหญ่ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Horitsu และคณะ (1988) ได้รายงานการเปลี่ยนแปลงขนาดของเซลล์ตรึงที่ใช้ในการผลิตกรดมะนาว พบว่าเซลล์ตรึงขนาดเล็กให้ปริมาณกรดมะนาวสูงกว่าขนาดใหญ่ และงานวิจัยของ Kautola และคณะ(1991) ก็พบเช่นเดียวกันว่าเมื่อลดขนาดของเซลล์ตรึงทำให้อัตราการผลิตกรดมะนาวเร็วขึ้น

4. <u>ความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ที่เหมาะสม</u>

เนื่องจากการตรึงเซลล์โดยใช้แคลเซียมอัลจิเนตเป็นสารพาหะ เกิดจากไอออนของโลหะไปแทนที่ไอออนของโซเดียม (Na^+) ที่ต่อกับกลุ่มคาร์บอกซิลของอัลจิเนต ทำให้เกิดเจลที่มีการกักขังเซลล์ไว้ภายใน งานวิจัยนี้ใช้โซเดียมอัลจิเนตผสมกับเซลล์แล้วหยดลงบนสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ ไอออนของโลหะคือแคลเซียมไอออน (Ca^{2+}) ในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์จะไปแทนที่โซเดียมไอออน (Na^+) ของโซเดียมอัลจิเนต ได้เซลล์ตรึงบนแคลเซียมอัลจิเนต ดังนั้นการทดลองนี้จึงหาความเข้มข้นของสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ที่เหมาะสมในการเตรียมเซลล์ตรึงเพื่อผลิตกรดมะนาว จากการทดลองพบว่าความเข้มข้นของสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ที่ใช้ในการเตรียมเซลล์ตรึง ไม่มีผลต่อความสามารถในการผลิตกรดมะนาว เนื่องจากเมื่อนำเซลล์ตรึงที่เตรียมได้จากสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0.25, 0.50 และ 0.75 โมลาร์ มาผลิตกรดมะนาว ได้ปริมาณกรดมะนาวสูงสุดใกล้เคียงกันคือ 136.80, 136.84 และ 135.94 กรัมต่อลิตรตามลำดับ ในวันที่ 8 ของการหมัก และมีอัตราการผลิตกรดมะนาวที่ใกล้เคียงกันประมาณ 26.64 กรัมต่อลิตรต่อวัน ดังนั้นเพื่อรักษาแคลเซียมไอออนให้มีปริมาณเกินพอในการตรึงเซลล์ การทดลองต่อไปจะเตรียมเซลล์ตรึง โดยใช้สารละลายแคลเซียม

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คลอไรด์ความเข้มข้น 0.25 โมลาร์

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาว โดยการใช้เซลล์ตรึงของเชื้อ *C. oleophila* C-73

1. ปริมาณเซลล์เริ่มต้นที่เหมาะสม

เมื่อใช้ปริมาณเซลล์ตรึงเริ่มต้นเท่ากับ 10, 20 และ 30 กรัมต่อลิตร ในการผลิตกรดมะนาว ทำให้การเจริญเพิ่มขึ้น แต่ปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้ในวันที่ 8 ของการหมักมีค่าใกล้เคียงกันคือประมาณ 136-137 กรัมต่อลิตร และอัตราการผลิตกรดมะนาวมีค่าใกล้เคียงกันประมาณ 26.64 กรัมต่อลิตรต่อวัน อาจเกิดจากข้อจำกัดของสารอาหารที่มีในปริมาณที่เท่ากัน ดังนั้นปริมาณเซลล์เริ่มต้นที่เหมาะสมเท่ากับ 10 กรัมต่อลิตรก็เพียงพอสำหรับการผลิตกรดมะนาว

2. ปริมาณกลูโคสเริ่มต้นที่เหมาะสม

การเลี้ยงเซลล์ตรึงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสเริ่มต้น 180 กรัมต่อลิตร น้ำตาลรีดิวส์ถูกใช้เกือบหมดตั้งแต่วันที่ 7 ของการหมัก ทำให้กรดมะนาวที่ผลิตได้เท่ากับ 124.47 กรัมต่อลิตรในวันที่ 7 ของการหมัก อาจเกิดจากกลูโคสเริ่มต้นไม่เพียงพอ และมีอัตราการผลิตกรดมะนาวประมาณ 36.00 กรัมต่อลิตรต่อวัน ส่วนปริมาณกลูโคสเริ่มต้นเท่ากับ 200 กรัมต่อลิตร ได้ปริมาณกรดมะนาว 136.73 กรัมต่อลิตร ในระยะเวลาการหมัก 8 วัน มีอัตราการผลิตกรดมะนาวประมาณ 28.56 กรัมต่อลิตรต่อวัน เมื่อเพิ่มกลูโคสเริ่มต้นเป็น 220 และ 250 กรัมต่อลิตร การผลิตกรดมะนาวจะช้าลง โดยมีอัตราการผลิตกรดมะนาวประมาณ 27.36 และ 20.64 กรัมต่อลิตรต่อวัน ตามลำดับ และมีปริมาณน้ำตาลรีดิวส์เหลือในน้ำหมักมากขึ้น ที่เวลาในการหมักเท่ากัน เมื่อคิดผลผลิตของกรดมะนาวเทียบกับปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ที่ใช้ไป ในวันที่ 8 ของการหมักเท่ากับร้อยละ 69.92, 67.36 และ 61.42 ที่ปริมาณกลูโคสเริ่มต้นเป็น 200, 220 และ 250 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ การที่อัตราการผลิตและผลผลิตลดลงเมื่อปริมาณกลูโคสเริ่มต้นเพิ่มขึ้น อาจเนื่องจากความหนืดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เพิ่มขึ้น ทำให้ประสิทธิภาพของการแลกเปลี่ยนออกซิเจน

(dissolve oxygen) ในอาหารเลี้ยงเชื้อลดลง มีผลทำให้การผลิตกรดมะนาวลดลง (Okashi et al.,1987) เช่นเดียวกับ Rymowicz และคณะ (1993) ที่ได้รายงานการลดลงของผลผลิตกรดมะนาว เมื่อเพิ่มปริมาณกลูโคส โดยการใช้เชื้อ *Y.lipolytica* A-101 ที่ตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต ดังนั้นปริมาณกลูโคสเริ่มต้นเท่ากับ 200 กรัมต่อลิตร จึงเหมาะสมต่อการผลิตกรดมะนาว

3. อายุของเซลล์ยีสต์ที่เหมาะสม

เมื่อใช้เซลล์ยีสต์อายุช่วงกลาง (15 ชั่วโมง), ช่วงปลายของระยะทวีคูณ (21 ชั่วโมง) และช่วงที่มีการเจริญคงที่ (24 ชั่วโมง) มาทำการตรึงเซลล์ แล้วนำเซลล์ตรึงนั้นมาผลิตกรดมะนาว พบว่าอายุของเซลล์ยีสต์ในอาหารสำหรับการเจริญเติบโต เมื่อนำมาตรึงเซลล์ ไม่มีผลต่อการผลิตกรดมะนาว โดยให้ปริมาณกรดมะนาวใกล้เคียงกันเท่ากับ 136.73, 137.77 และ 138.21 กรัมต่อลิตร ในเวลา 8 วันของการหมัก และไม่มีผลต่ออัตราเร็วในการผลิตกรดมะนาว โดยมีอัตราการผลิตกรดมะนาวใกล้เคียงกันประมาณ 28.08 กรัมต่อลิตรต่อวัน เมื่อใช้เซลล์ยีสต์ที่มีอายุในอาหารสำหรับการเจริญเติบโตเท่ากับ 15, 21 และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ เพื่อลดปริมาณอาหารสำหรับการเจริญเติบโตและให้ได้ปริมาณเซลล์ยีสต์มากที่สุด จึงเลือกใช้ยีสต์ที่มีอายุในช่วงปลายของระยะทวีคูณ (21 ชั่วโมง) เมื่อเลี้ยงในอาหารสำหรับการเจริญเติบโต โดยมีน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 6.0 กรัมต่อลิตร โดยไม่จำเป็นต้องเลี้ยงเซลล์ในอาหารสำหรับการเจริญเติบโตนานถึง 24 ชั่วโมง ในขณะที่มีน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากัน แต่สูงกว่าในช่วงกลางของระยะทวีคูณ (15 ชั่วโมง) ซึ่งมีน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 4.0 กรัมต่อลิตร

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

การเปรียบเทียบการผลิตกรดมะนาว โดยการใช้เซลล์ตรึงและเซลล์อิสระของเชื้อ *C. oleophila* C-73 พบว่าค่าความเป็นกรด-ด่างมีค่าลดลงเช่นเดียวกัน เมื่อใช้แคลเซียมคาร์บอเนตปริมาณ 100 กรัมต่อลิตร เป็นสารควบคุมความเป็นกรด-ด่าง เซลล์ยีสต์มีการใช้น้ำตาลในการเจริญและการผลิตกรดมะนาว เมื่อเวลาในการหมักนานขึ้น การ

เจริญมีค่าเพิ่มขึ้น จนถึงวันที่ 7 ของการหมัก การใช้เซลล์อิสระนั้นการเจริญและการผลิตกรดมะนาวเริ่มช้าลง และมีปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้สูงสุดเท่ากับ 128.53 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 7 ของการหมัก มีอัตราการผลิตกรดมะนาวประมาณ 24.67 กรัมต่อลิตรต่อวัน ส่วนการใช้เซลล์ตรึงยังคงมีการเจริญและการผลิตกรดมะนาว ประกอบกับการมีเซลล์ตรึงด้วย ซึ่งอาจมีอิทธิพลในการทำให้การผลิตกรดมะนาวโดยการใช้เซลล์ตรึงมีค่ามากขึ้นด้วย โดยปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้สูงสุดเท่ากับ 138.76 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 8 ของการหมัก มีอัตราการผลิตกรดมะนาวประมาณ 26.67 กรัมต่อลิตรต่อวัน ในกรณีนี้จะเห็นว่าข้อจำกัดในด้านการแพร่ผ่านของสารอาหารที่เซลล์ตรึงได้รับน้อยกว่าการใช้เซลล์อิสระนั้น มีความสำคัญน้อยลง เมื่อเทียบกับประโยชน์ที่ได้รับจากการที่ตรึงเซลล์ไว้ในสารพาหะ ทำให้เซลล์มีความเสถียรมากกว่าเซลล์อิสระ นอกจากนี้ยังเป็นการป้องกันและคุ้มครองเซลล์จากการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมภายนอกที่วิกฤตต่อเซลล์ได้ ในบางโอกาสจะทำให้การผลิตสารได้มากขึ้นและเซลล์มีอายุการใช้งานที่ยาวนานขึ้นด้วย (ภาวิณี, 2531)

เนื่องจากการผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อ *C. oleophila* C-73 เป็นการหมักในสภาวะที่ต้องการออกซิเจน Okashi และคณะ (1987) ได้รายงานการเพิ่มปริมาณออกซิเจนที่ละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อ จะทำให้การผลิตกรดมะนาวเพิ่มสูงขึ้นและปริมาณกรดไอโซซิตริกจะลดลง การกวน (agitation) อาหารเลี้ยงเชื้อเป็นวิธีหนึ่งที่ช่วยเพิ่มการละลายและการถ่ายเทออกซิเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ดีขึ้น เมื่อพิจารณาการใช้เซลล์ตรึงในการผลิตกรดมะนาวนั้น มีเม็ดเซลล์ตรึงในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งทำให้เกิดการกวนมากกว่าการใช้เซลล์อิสระ เซลล์ตรึงสามารถสัมผัสกับอาหารได้ดีกว่า การละลายและการถ่ายเทออกซิเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มขึ้นด้วย จึงอาจมีผลในการทำให้การใช้เซลล์ตรึงมีการผลิตกรดมะนาวสูงกว่าการใช้เซลล์อิสระ นอกจากนี้ Hamada และคณะ (1990) รายงานว่าเซลล์ที่อยู่ภายในเม็ดเซลล์ตรึง มีอิทธิพลและมีความสำคัญในการช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของการผลิตผลิตภัณฑ์ อีกทั้ง Maddox และ Kingston (1983) ได้รายงานผลผลิตกรดมะนาวเมื่อใช้เซลล์อิสระมีค่าน้อยกว่าเมื่อใช้เซลล์ตรึงด้วยโพลิอะคริลาไมด์ด้วย จากการทดลองพบว่าหลังการผลิตกรดมะนาวได้ปริมาณสูงสุดแล้ว ในเวลาต่อมาปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้มีค่าลดลง กรณีนี้อาจเนื่องจากการผลิตกรดมะนาวที่มากเกินไป (citric acid over-production) ทำให้เกิดความผิดปกติของเอนไซม์อะโคนิเทส (aconitase) ที่มี

กิจกรรมสูงขึ้น มีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนรูปของซิตริค (citric) เป็นไอโซซิตริค (iso-citric) และในกรณีที่มีเอนไซม์อื่น ๆ อาจทำให้เกิดการเปลี่ยนรูปเป็นสารอื่นในวัฏจักรเครบได้ (Burden and Eveleigh, 1990; Lockwood and Schweiger,1976)

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

ในระหว่างการเลี้ยงเชื้อยีสต์ เพื่อการผลิตกรดมะนาว มีการควบคุมความเป็นกรด-ด่างให้คงที่ โดยการเติมแคลเซียมคาร์บอเนต เพื่อป้องกันการเป็นพิษต่อเซลล์ยีสต์ การทดลองในระดับขวดเขย่า ใช้แคลเซียมคาร์บอเนต เกรดระดับห้องปฏิบัติการ (lab grade) ซึ่งมีราคาสูงถึง 370 บาทต่อกิโลกรัม (ภาคผนวก ง) เพื่อเป็นแนวทางในการผลิตในระดับขยายส่วน จึงทดลองเปลี่ยนชนิดของแคลเซียมคาร์บอเนตเป็นเกรดระดับอุตสาหกรรม (industrial grade) ซึ่งมีราคา 10 บาทต่อกิโลกรัม (ภาคผนวก ง) จากการทดลองพบว่า เมื่อใช้แคลเซียมคาร์บอเนตเกรดระดับห้องปฏิบัติการ และระดับอุตสาหกรรม (ปริมาณ 100 กรัมต่อลิตร) มีปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้เท่ากับ 138.77 และ 98.79 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ จะเห็นว่าเมื่อใช้เกรดระดับอุตสาหกรรม ปริมาณกรดมะนาวที่ได้มีค่าลดลง 29 เปอร์เซนต์ อาจเนื่องจากความไม่บริสุทธิ์ของแคลเซียมคาร์บอเนตที่ใช้ เนื่องจากรายงานของ Furukawa และคณะ (1977) และ Marison (1988) ที่ได้พบว่าไอออนของโลหะ เช่นเหล็ก (Fe^{2+}), คอปเปอร์ (Cu^{2+}) และซิงค์ (Zn^{2+}) มีผลทำให้ผลผลิตกรดมะนาวของยีสต์ลดลง นอกจากนี้เรวดี (2535) และประเสริฐ (2537) ได้รายงานผลของไอออนของเหล็ก มีผลทำให้การผลิตกรดมะนาวของ *C. oleophila* C-73 ลดลงเช่นเดียวกัน ดังนั้นจึงพิจารณาองค์ประกอบของแคลเซียมคาร์บอเนตที่ใช้ (ภาคผนวก ง) พบว่าเกรดระดับอุตสาหกรรมมีไอออนของเหล็กปริมาณสูงถึง 0.2 เปอร์เซนต์ ในขณะที่เกรดระดับห้องปฏิบัติการมีไอออนของเหล็กเพียง 0.005 เปอร์เซนต์ เท่านั้น จึงอาจเป็นสาเหตุทำให้ปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้ลดลง

ปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตเกรดระดับอุตสาหกรรมที่เหมาะสมคือ 100 กรัมต่อลิตร ปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้เท่ากับ 98.79 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 8 ของการหมัก ในขณะที่ใช้ปริมาณ 80 กรัมต่อลิตร ปริมาณกรดมะนาวที่ได้น้อยกว่าคือ 96.55 กรัมต่อลิตร

และเมื่อใช้ปริมาณเพิ่มขึ้นเป็น 120 และ 140 กรัมต่อลิตร ปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้มีค่าลดลงเท่ากับ 86.07 และ 75.47 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากปริมาณไอออนของเหล็กมีปริมาณมากขึ้น ทำให้มีผลยับยั้งการผลิตกรดมะนาวมากขึ้น และการที่มีปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตมากขึ้น อาหารเลี้ยงเชื้อจะมีลักษณะขุ่นข้น (muddied culture) มีผลให้ประสิทธิภาพของการแลกเปลี่ยนออกซิเจน ระหว่างอากาศและอาหารเลี้ยงเชื้อ (dissolve oxygen) ลดลง (Furukawa et al.,1977) อาจเป็นสาเหตุทำให้ปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้มีค่าลดลงด้วย เมื่อเพิ่มปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตมากขึ้น แต่อย่างไรก็ตาม สามารถใช้แคลเซียมคาร์บอเนตเกรดระดับอุตสาหกรรม (ปริมาณ 100 กรัมต่อลิตร) ซึ่งมีราคาถูกกว่าเกรดระดับห้องปฏิบัติการถึง 37 เท่า เป็นตัวควบคุมความเป็นกรด-ด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ โดยปริมาณกรดมะนาวที่ได้มีค่าลดลง 29 เปอร์เซนต์ เมื่อเทียบกับการใช้เกรดระดับห้องปฏิบัติการ

<u>การศึกษาผลของสภาวะและระยะเวลาในการเก็บเซลล์ตรึง ที่มีต่อการผลิตกรดมะนาวโดยการใช้เซลล์ตรึงของเชื้อ *C .oleophila* C-73</u>

1. <u>เมื่อทำเป็นเซลล์ตรึงอบแห้ง</u>

จากการทดลองพบว่า การอบแห้งเซลล์ตรึงเป็นการระเหยน้ำออกจากเจลโดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ตรึง (Mortinsen et al.,1982) และการอบแห้งเมื่อใช้อุณหภูมิต่างกัน ไม่มีผลต่อขนาดของเซลล์ตรึงอบแห้งทั้งก่อนและหลังการผลิตกรดมะนาว แต่พบว่าขนาดของเซลล์ตรึงที่อบแห้งแล้วเล็กลงประมาณ 2 เท่า เมื่อเทียบกับขนาดของเซลล์ตรึงก่อนการอบแห้ง และเมื่อใช้ผลิตกรดมะนาวแล้วมีขนาดใหญ่ขึ้นประมาณ 0.6 เท่า เมื่อเทียบกับเซลล์ตรึงหลังการอบแห้ง ขนาดของเซลล์ตรึงที่เปลี่ยนแปลงจากการอบแห้งนี้เกิดขึ้นในลักษณะเดียวกับที่ Hamemci และ Hang (1989) ได้รายงานไว้

Klein และคณะ (1983) รายงานว่า การอบแห้งทำให้ขนาดของเซลล์ตรึงลดลง แต่ไม่ได้ทำให้รูพรุน (pore size) ของสารพาหะลดลง ดังนั้นการอบแห้งอาจไม่มีผลต่อการแพร่ของสารผ่านสารพาหะ แต่อาจมีผลต่อเซลล์ยีสต์ จะเห็นว่าเมื่ออบแห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส การเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาณกรดมะนาวและน้ำตาล

รีดิวส์ที่ใช้ไปมีค่าน้อยมาก อาจเกิดจากการที่ยีสต์ไม่สามารถทนอุณหภูมิที่ใช้ในการอบแห้งได้ ในขณะที่ยีสต์มีการเจริญในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาว เมื่อใช้อุณหภูมิในการอบแห้งเท่ากับ 20, 30 และ 40 องศาเซลเซียส เซลล์ตรึงสามารถผลิตกรดมะนาวได้ปริมาณใกล้เคียงกันคือประมาณ 100 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 8 ของการหมัก คิดเป็นปริมาณกรดมะนาวลดลงประมาณ 26 เปอร์เซนต์ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ตรึงที่ไม่ได้ผ่านการอบแห้ง หลังจากเก็บเซลล์ตรึงที่อบแห้งนี้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่าเซลล์ยังคงมีการเจริญเมื่อเลี้ยงในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาว โดยปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้มีค่าลดลงเมื่อเวลาในการเก็บเพิ่มขึ้น และเมื่อเก็บเป็นเวลา 60 วัน ปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้ในวันที่ 8 ของการหมัก ลดลง 47 เปอร์เซนต์ เมื่อเทียบกับเซลล์ตรึงที่ไม่ได้อบแห้ง แต่ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ที่เหลือมีค่ามากเมื่อเวลาในการเก็บนานขึ้น อาจเกิดจากสภาวะในการเก็บที่ไม่มีอาหารเลี้ยงเชื้อและระยะเวลาในการเก็บนานขึ้น เมื่อนำเซลล์มาเลี้ยงใหม่ เซลล์ยีสต์อาจต้องใช้ช่วงเวลาของการปรับตัวให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมใหม่นานกว่าปกติ หรือใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม เพื่อเซลล์สามารถนำไปใช้ในการเจริญสร้างเซลล์ใหม่ทดแทนเซลล์ที่ตาย หรือซ่อมแซมส่วนที่สึกหรอให้มีเมตาบอลิซึมดังเดิม ดังนั้นการอบแห้งเซลล์ตรึงอาจใช้เป็นเทคนิคใหม่สำหรับการเก็บรักษาเซลล์ตรึงได้ โดยปริมาตรที่ใช้ในการเก็บน้อยลงทำให้สะดวกต่อการเก็บรักษา

2. <u>เมื่อเก็บเซลล์ตรึงในสภาวะต่าง ๆ</u>

เมื่อเวลาในการเก็บนานขึ้น ปริมาณกรดมะนาวที่เซลล์ตรึงผลิตได้ลดลงเล็กน้อย อาจเนื่องจากสภาวะในการเก็บที่ไม่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อนำเซลล์ตรึงมาใช้ใหม่นั้นเซลล์ตรึงอาจต้องใช้เวลาในการปรับตัว เพื่อให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมใหม่นานขึ้นหรืออาจเกิดจากความผิดปกติของเซลล์ที่สูญเสียความสามารถในการผลิตกรดมะนาว ที่เวลาในการเก็บเท่ากัน เมื่อเก็บเซลล์ตรึงในสภาวะชื้น ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์หรือในน้ำกลั่น แล้วนำเซลล์ตรึงมาใช้ผลิตกรดมะนาว ปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้มีค่าแตกต่างกันเล็กน้อย โดยเมื่อเก็บเป็นเวลา 60 วัน ปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้ลดลง 10,12,19 และ 24 เปอร์เซนต์ เมื่อเก็บเซลล์ตรึงในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ สภาพชื้น สารละลายแคลเซียมคลอไรด์และในน้ำกลั่น ตามลำดับ ทั้งนี้อาจเนื่อง

มาจากการเก็บในน้ำกลั่นทำให้โครงสร้างของเซลล์ตรึงมีความแข็งแรงลดลง อาจมีผลให้ปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้ลดลง การเก็บในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์เป็นการรักษาความแข็งแรงของเม็ดเซลล์ตรึง แต่บางกรณีเซลล์ยีสต์อาจได้รับความกระทบกระเทือนจากแคลเซียมอิออน (Ca^{2+}) ในแคลเซียมคลอไรด์ เมื่อเก็บเซลล์ตรึงไว้เป็นเวลานาน อาจมีผลยับยั้งเมตาบอลิซึมของเซลล์ได้ (Bucke,1987) ในขณะที่เมื่อเก็บในสภาวะชื้นและในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ เซลล์ตรึงไม่ได้รับผลกระทบจากสิ่งแวดล้อมภายนอก ประกอบกับการที่โซเดียมคลอไรด์เป็น isoelectric solution ซึ่งช่วยรักษาสภาพสมดุลของเซลล์ตรึงและเจลให้คงอยู่ ทำให้ปริมาณกรดมะนาวที่ได้ลดลงน้อยกว่าเมื่อเก็บในสภาวะอื่น

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

เซลล์ตรึงของเชื้อ *C. oleophila* C-73 สามารถนำมาใช้ซ้ำในการผลิตกรดมะนาวได้หลายครั้งเป็นเวลานาน โดยที่ความสามารถในการผลิตกรดมะนาวลดลงไม่มากนัก แต่จากงานวิจัยพบว่าปริมาณกรดมะนาวบางครั้งมีค่าเพิ่มขึ้นหรือลดลงนั้น อาจเนื่องจากระยะเวลาที่ต่างกันในการเก็บเซลล์ตรึงเพื่อทำการทดลองครั้งต่อไป เมื่อนำมาใช้อาจต้องใช้เวลาในการปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมใหม่ที่ต่างกัน จากการทดลองใช้เซลล์ตรึงของเชื้อ *C. oleophila* C-73 ซ้ำในการผลิตกรดมะนาวได้อย่างน้อย 12 ครั้ง

<u>สรุปผลการทดลอง</u>

1. แคลเซียมอัลจิเนตเป็นสารพาหะที่เหมาะสม สำหรับการตรึงเซลล์ยีสต์ *C. oleophila* C-73 เพื่อผลิตกรดมะนาว

2. ความเข้มข้นของแคลเซียมอัลจิเนตเพิ่มขึ้น ก่อให้เกิดความแข็งแรงของเม็ดเจลมาก รูพรุนของเม็ดเจลลดลง จำนวนเซลล์ถูกกักขังไม่หลุดออกมีผลให้ผลผลิตกรดมะนาวสูงกว่าปกติ แต่ความเข้มข้นของแคลเซียมอัลจิเนตที่มากเกินไป รูพรุนของเม็ดเจลอาจเล็กมาก การเคลื่อนที่ของอาหารผ่านเม็ดเจลเข้าไปได้ยาก มีผลทำให้อัตราการผลิตกรดมะนาวและปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้มีค่าลดลงด้วย

3. อัตราส่วนของเซลล์ต่อแคลเซียมอัลจิเนตที่ใช้ในการตรึงเซลล์ ไม่มีผลต่ออัตราการผลิตกรดมะนาวและปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้ในระบบเซลล์ตรึง

4. ขนาดของเซลล์ตรึงที่เพิ่มขึ้น มีผลให้พื้นที่ผิวสัมผัสของอาหารกับเซลล์ตรึงลดลง ดังนั้นอัตราการผลิตและกรดมะนาวที่ผลิตได้ลดลง

5. ความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ที่ใช้ในการตรึงเซลล์ที่เพียงพอ ไม่มีผลต่อความสามารถในการผลิตกรดมะนาวในระบบเซลล์ตรึง

6. เมื่อปริมาณเซลล์ตรึงเริ่มต้นเพิ่มขึ้นจาก 10 ถึง 30 กรัมต่อลิตร การเจริญของเซลล์เพิ่มขึ้น แต่อัตราการผลิตและปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้มีค่าใกล้เคียงกัน

7. ปริมาณกลูโคสที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มขึ้น ปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้มีค่าเพิ่ม แต่ในกรณีที่มีกลูโคสมากเกินไปนั้น อาหารเลี้ยงเชื้อมีความหนืดสูง ประสิทธิภาพในการแลกเปลี่ยนออกซิเจนลดลง มีผลทำให้อัตราการผลิตและปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้มีค่าลดลง

8. อายุของเซลล์ยีสต์ที่เลี้ยงในอาหารสำหรับการเจริญเติบโต เมื่อนำมาทำเป็นเซลล์ตรึง ไม่มีผลต่ออัตราการผลิตกรดมะนาวและปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้ ในระบบเซลล์ตรึง

9. สภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเซลล์ *C. oleophila* C-73 เพื่อผลิตกรดมะนาว คือ ผสมเซลล์ยีสต์ 1.0 กรัม (น้ำหนักเซลล์แห้ง) กับสารละลายโซเดียมอัลจิเนตความเข้มข้น 4 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 25 มิลลิลิตร หยดลงบนสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.25 โมลาร์ เตรียมเซลล์ตรึงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยประมาณ 0.3-0.4 เซนติเมตร

10. เชื้อ *C. oleophila* C-73 ที่ตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต เมื่อเลี้ยงในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาวที่มีกลูโคส 200 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน ใช้ปริมาณเซลล์ตรึงเริ่มต้น 10 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที มีอัตราการผลิตกรดมะนาวประมาณ 26.67 กรัมต่อลิตรต่อวัน ปริมาณกรดมะนาวสูงสุดเท่ากับ 138.76 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 8 ของการหมัก สูงกว่าการใช้เซลล์อิสระประมาณ 8 เปอร์เซนต์ โดยปริมาณกรดมะนาวสูงสุดที่ผลิตได้โดยการใช้เซลล์อิสระเท่ากับ 128.53 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 7 ของการหมัก และมีอัตราการผลิตกรดมะนาว

ประมาณ 24.67 กรัมต่อลิตรต่อวัน

11. สามารถใช้แคลเซียมคาร์บอเนต เกรดระดับอุตสาหกรรม (ปริมาณ 100 กรัมต่อลิตร) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ปรากฏว่าปริมาณกรดมะนาวที่เซลล์ตรึงผลิตได้น้อยกว่าเกรดระดับห้องปฏิบัติการประมาณ 29 เปอร์เซนต์ แต่มีราคาถูกกว่าประมาณ 37 เท่า

12. การอบแห้งเซลล์ตรึง อาจใช้เป็นเทคนิคใหม่สำหรับการเก็บรักษาเซลล์ตรึงได้ โดยปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้หลังการอบแห้งลดลงประมาณ 26 เปอร์เซนต์ เมื่อเทียบกับเซลล์ตรึงที่ไม่ได้อบแห้ง และเมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 60 วัน ปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้ลดลงประมาณ 47 เปอร์เซนต์ เมื่อเทียบกับเซลล์ตรึงที่ไม่ได้อบแห้งและไม่ได้เก็บ

13. เซลล์ตรึงสามารถเก็บรักษาได้ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ สภาวะชื้น สารละลายแคลเซียมคลอไรด์และน้ำกลั่น ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 วัน โดยปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้ลดลงประมาณ 10,12,19 และ 24 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ เมื่อเทียบกับเซลล์ตรึงที่ไม่ได้เก็บ

14. เซลล์ตรึงของเชื้อ *C. oleophila* C-73 สามารถใช้ซ้ำ ในการผลิตกรดมะนาวได้อย่างน้อย 12 ครั้ง

15. จากการที่เซลล์ตรึงของเชื้อ *C. oleophila* C-73 ผลิตกรดมะนาวได้ปริมาณสูงกว่าการใช้เซลล์อิสระและสามารถใช้เซลล์ตรึงซ้ำได้นี้ นับว่าเป็นประโยชน์ของการใช้เทคนิคการตรึงเซลล์จุลินทรีย์ในการปรับปรุงกระบวนการผลิตกรดมะนาว และการตรึงเซลล์นี้ยังเป็นการรักษาเซลล์ยีสต์ให้มีอายุการใช้งานที่ยาวนานขึ้น นอกจากนี้เป็นการลดต้นทุนการผลิตในด้านการเตรียมหัวเชื้อที่ใช้ในการผลิตกรดมะนาวไปได้ส่วนหนึ่ง จึงเห็นว่าควรนำมาปรับปรุงใช้ในการผลิตกรดมะนาวในระดับขยายส่วน และใช้ในกระบวนการหมักแบบต่อเนื่องต่อไป