การผลิตกรดมะนาวโดย *Candida oleophila* NN-39
จากสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลัง

นางสาวสินีนาถ เจียมอนุกูลกิจ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
หลักสูตรเทคโนโลยีทางชีวภาพ
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2539
ISBN 974-635-405-1
ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I 17601925

PRODUCTION OF CITRIC ACID BY *Candida oleophila* NN-39 FROM HYDROLYSATE OF CASSAVA PULP

Miss Sineenat Jeamanukulkit

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science
Programme of Biotechnology
Graduate School
Chulalongkorn University
Academic Year 1996

ISBN 974-635-405-1

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การผลิตกรดมะนาวโดย *Candida oleophila* NN-39 จากสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลัง
โดย	นางสาวสินีนาถ เจียมอนุกูลกิจ
ภาควิชา	หลักสูตรเทคโนโลยีทางชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร. นลิน นิลอุบล
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุรพงศ์ นวังคสัตถุศาสน์

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ศุภวัฒน์ ชุติวงศ์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเมธ ตันตระเธียร)

.....อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ ดร. นลิน นิลอุบล)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุรพงศ์ นวังคสัตถุศาสน์)

.....กรรมการ
(อาจารย์ วาสนา โตเลี้ยง)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

สินีนาถ เจียมอนุกูลกิจ : การผลิตกรดมะนาวโดย *Candida oleophila* NN-39 จากสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลัง (PRODUCTION OF CITRIC ACID BY *Candida oleophila* NN-39 FROM HYDROLSATE OF CASSAVA PULP) อาจารย์ที่ปรึกษา : รศ.ดร.นลิน นิลอุบล อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม : รศ.ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ และ ผศ.ดร.สุรพงศ์ นวังคสัตถุศาสน์, 97 หน้า.
ISBN 974-635-405-1

กากมันสำปะหลังมีแป้งเป็นองค์ประกอบประมาณร้อยละ 50 โดยน้ำหนักแห้ง จึงมีความเป็นไปได้สูงในการที่จะแปรรูปกากมันสำปะหลังไปเป็นสารละลายน้ำตาลเพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในอุตสาหกรรมหมัก งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาการผลิตกรดมะนาวจากสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรด โดยการหมักด้วยยีสต์ *Candida oleophila* NN-39 พบว่าสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังมีสารเจือปนที่ทำให้ผลผลิตกรดมะนาวลดลง สารเจือปนในสารละลายน้ำตาลอาจมาจากสารที่มีในกากมันซึ่งสามารถกำจัดออกได้บางส่วนโดยการล้างน้ำหรือเกิดจากกระบวนการเตรียมสารละลายน้ำตาลซึ่งย่อยกากมันด้วยกรดและปรับให้เป็นกลางด้วยด่าง จากผลงานวิจัยที่รายงานนี้พบว่า เกลือโซเดียมคลอไรด์ที่มีปริมาณสูงกว่า 0.04 โมลาร์ โซเดียมซัลเฟตสูงกว่า 0.01 โมลาร์ แคลเซียมคลอไรด์สูงกว่า 0.06 โมลาร์ ทำให้ผลผลิตกรดมะนาวลดลง ส่วนเกลือแคลเซียมซัลเฟตปริมาณที่ละลายได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อไม่มีผลต่อการผลิตกรดมะนาว และสารละลายน้ำตาลที่มีสีคล้ำที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตรสูงกว่า 1.940 มีผลทำให้การผลิตกรดมะนาวลดลง ดังนั้นจึงเตรียมสารละลายน้ำตาลโดยใช้กากมันสำปะหลังที่ผ่านการล้างน้ำแล้วผ่านกระบวนการย่อยด้วยกรดซัลฟิวริกและปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เป็นกลางด้วยแคลเซียมคาร์บอเนต หลังจากกรองกำจัดแคลเซียมซัลเฟตออกแล้วนำไปผ่านผงถ่านกัมมันต์เพื่อลดระดับของสารสีคล้ำให้ต่ำกว่า 1.940 จากการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดมะนาวในระดับถังหมัก 5 ลิตร ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้สารละลายน้ำตาลที่เตรียมได้เป็นแหล่งคาร์บอน โดยใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร และรักษาระดับน้ำตาลกลูโคสระหว่างการหมักไว้ประมาณ 50 กรัมต่อลิตร โดยการเติมอย่างต่อเนื่องจนปริมาณน้ำตาลรวมเท่ากับ 220 กรัมต่อลิตร ได้ปริมาณกรดมะนาว 151.49 และ 162.32 กรัมต่อลิตร คิดเป็นผลผลิตกรดมะนาว (Yp/s) เท่ากับ 0.75 และ 0.71 ที่ระยะเวลาการหมัก 96 และ 120 ชั่วโมงตามลำดับ และน้ำหมักที่ได้มีความหนืดต่ำ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา ..... ลายมือชื่อนิสิต .....
สาขาวิชา ...หลักสูตรเทคโนโลยีทางชีวภาพ... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....
ปีการศึกษา ...2539... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

C727028 MAJOR BIOTECHNOLOGY
KEY WORD: CITRIC ACID /HYDROLYSED CASSAVA PULP /*Candida oleophila*

SINEENAT JEAMANUKULKIT : PRODUCTION OF CITRIC ACID BY *Candida oleophila* NN-39 FROM HYDROLSATE OF CASSAVA PULP. THESIS AVISOR: ASSO.PROF. NALINE NILUBOL, Ph.D. THESIS CO-ADVISOR: ASSO.PROF. PAIROH PINPHANICHAKARN, Ph.D. AND ASST.PROF. SURAPONG NAVANKASATTUSAS, Ph.D. 97 pp. ISBN 974-635-405-1

The starch content of cassava pulp was found to be approximately 50% dry basis. It is therefore, highly probable to further process the cassava pulp to obtain sugar syrup for carbon source in fermentation industries. This research explored the application of the sugar syrup, obtained from the acid hydrolysed cassava pulp, for citric acid production by fermentation using *Candida oleophila* NN-39. The impurity in sugar syrup from hydrolysed cassava pulp reduced productivity of the citric acid production. The relevant impurity may be chemical components of cassava pulp which may be partially leached with water or derivatives from sugar syrup preparation namely acid hydrolysis of the cassava pulp and subsequent neutralisation with alkaline. Production medium with concentration of sodium chloride over 0.04 M, sodium sulfate over 0.01 M, or calcium chloride over 0.06 M decreased the citric acid productivity. Soluble calcium sulfate, however, had no effect on citric acid productivity. Dark brown sugar syrup with 420 nm optical absorbance above 1.940 would decrease citric acid productivity. The sugar syrup was therefore prepared by hydrolysing water washed cassava pulp with sulfuric acid, and subsequently neutralised with calcium carbonate. Insoluble calcium sulfate was eliminated by filtration. The filtrate was decolorized by treating with activated carbon giving sugar syrup with optical absorbance at 420 nm below 1.940. Citric acid production in 5 liter fermenter using the sugar syrup as a carbon source gave citric acid of 151.49 g/l and 162.32 g/l with the yield ($Y_{P/S}$) of 0.75 and 0.71 over fermentation period of 96 hrs and 120 hrs, respectively. The initial glucose concentration of the medium was 100 g/l and the concentration was then maintained at 50 g/l throughout the process by continuous adding the concentrated glucose syrup until 220 g/l of total glucose provision was attained. The fermentation broth was also relatively less viscous.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา..... ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา หลักสูตรเทคโนโลยีทางชีวภาพ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา 2539 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาระดับปริญญามหาบัณฑิต และวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ได้โดยได้รับความกรุณาจาก รองศาสตราจารย์ ดร. นลิน นิลอุบล รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุรพงศ์ นวังควัตถุศาสน์ อาจารย์ที่ปรึกษาและที่ปรึกษาร่วม ตลอดจนให้คำแนะนำแนวทางในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ดิฉันขอกราบขอบพระคุณไว้ ณ.ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเมธ ตันตระเธียร และ อาจารย์ วาสนา โดเลี้ยง ที่กรุณารับเป็นกรรมการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณ คณะผู้บริหารสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาเอื้อเฟื้อ สถานที่ อุปกรณ์ และสารเคมี ในการทำวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติที่กรุณาให้ความช่วยเหลือด้านทุนการศึกษาและทุนอุดหนุนในการทำวิจัย

ขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่เทคนิคและนักวิจัยของสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทุกท่านที่ได้ให้ความช่วยเหลือในระหว่างการทำวิจัย

ขอขอบคุณ โรงแป้งกิจรุ่งเรือง จังหวัดระยอง ที่กรุณาอนุเคราะห์กากมันสำปะหลังซึ่งใช้เป็นวัตถุดิบในการทำวิจัย

ขอขอบคุณ คุณเชาวรีย์ อมรสมานกุล และพี่ๆ ทุกคนที่ให้ความช่วยเหลือและให้กำลังใจมาตลอด

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ และทุกคนในครอบครัวที่ได้ช่วยเหลือสนับสนุนทั้งกำลังกาย กำลังใจ และกำลังทรัพย์ในระหว่างการศึกษาตลอดมา

สุดท้ายนี้ ข้าพเจ้าขออุทิศความดีอันเกิดจากประโยชน์ของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้แด่ดวงวิญญาณของ คุณแม่เปรมจิตร เจียมอนุกูลกิจ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ
กิตติกรรมประกาศ..... ฉ
สารบัญ..... ช
สารบัญตาราง..... ญ
สารบัญรูป..... ต
คำย่อ..... ป

บทที่

1 บทนำ

1.1 ประวัติความเป็นมา..... 1
1.2 การผลิตกรดมะนาวโดยการหมักด้วยเชื้อยีสต์..... 2
1.3 ชีวเคมีของการผลิตกรดมะนาวโดยยีสต์..... 3
1.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดมะนาวโดยยีสต์..... 5
1.5 คุณสมบัติของกรดมะนาว..... 7
1.6 มาตรฐานของกรดมะนาว..... 8
1.7 ประโยชน์ของกรดมะนาว..... 8
1.8 การใช้ประโยชน์จากกากมันสำปะหลัง..... 9
1.9 มูลเหตุจูงใจในการทำวิจัย..... 10
1.10 ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย..... 11

2 วิธีการทดลอง

2.1 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง..... 12
2.2 เชื้อจุลินทรีย์..... 14
2.3 การเก็บรักษาและการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดมะนาว..... 14
2.4 วิธีวิเคราะห์..... 15

สารบัญ(ต่อ)

บทที่ หน้า

3 ผลการทดลอง

3.1 การศึกษาลักษณะการเจริญและการผลิตกรดมะนาวโดยยีสต์ *Candida oleophila* NN-39 ในระดับขวดเขย่า 18

3.1.1 ลักษณะการเจริญของ *Candida oleophila* NN-39 ในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ 18

3.1.2 ลักษณะการเจริญ การผลิตกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก และการใช้น้ำตาลของ *Candida oleophila* NN-39 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวซึ่งมีแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์เป็นแหล่งคาร์บอน 20

3.2 การศึกษาอิทธิพลของสารเจือปนในสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดต่อการผลิตกรดมะนาวโดยยีสต์ *Candida oleophila* NN-39 ในระดับขวดเขย่า 23

3.2.1 อิทธิพลของเกลือต่าง ๆ ต่อประสิทธิภาพการผลิตกรดมะนาว 23

3.2.1.1 ผลของเกลือโซเดียมคลอไรด์ต่อการเจริญและการผลิตกรดมะนาว 24

3.2.1.2 ผลของเกลือโซเดียมซัลเฟตต่อการเจริญและการผลิตกรดมะนาว 24

3.2.1.3 ผลของเกลือแคลเซียมคลอไรด์ต่อการเจริญและการผลิตกรดมะนาว 30

3.2.1.4 ผลของเกลือแคลเซียมซัลเฟตต่อการเจริญและการผลิตกรดมะนาว 33

3.2.2 ผลของสารสีคล้ำ(Browning)ในสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดซัลฟิวริกต่อการเจริญและการผลิตกรดมะนาว... 36

3.2.3 ผลของการลดปริมาณสารที่มีอิทธิพลต่อการผลิตกรดมะนาวในสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดซัลฟิวริกต่อการเจริญและการผลิตกรดมะนาว 38

3.2.4 ผลของสารตกค้างในกากมันสำปะหลังที่สามารถกำจัดออกได้โดยการล้างน้ำต่อการผลิตกรดมะนาว 44

3.2.5 ผลของกรดซัลฟิวรัสที่อาจตกค้างในกากมันสำปะหลังต่อการผลิตกรดมะนาว 47

สารบัญ(ต่อ)

หน้า

3.2.6 ผลของการใช้สารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดซัลฟิวริกหลังผ่านตัวกลางแลกเปลี่ยนประจุภาคชนิดต่าง ๆ เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับผลิตกรดมะนาว..... 52
3.2.7 ศึกษาลักษณะการเจริญและการผลิตกรดมะนาวโดยยีสต์ *Candida oleophila* NN-39 ในระดับขวดเขย่าเมื่อใช้สารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดซัลฟิวริกเป็นแหล่งคาร์บอน.. 55
3.2.8 ผลของการใช้สารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์เป็นแหล่งคาร์บอน..... 58
3.3 การศึกษาประสิทธิภาพการผลิตกรดมะนาวในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร เมื่อใช้สารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดซัลฟิวริกเป็นแหล่งคาร์บอน..... 65
3.3.1 การเจริญและการผลิตกรดมะนาวในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร เมื่อใช้สารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดซัลฟิวริกเป็นแหล่งคาร์บอน..... 65
3.3.2 ผลการควบคุมระดับความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสในการผลิตกรดมะนาวระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร เมื่อใช้สารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดซัลฟิวริกเป็นแหล่งคาร์บอน. 70
4 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง..... 74
รายการอ้างอิง..... 78
ภาคผนวก..... 82
ก การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ..... 82
ข - การย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์..... 87
- การย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดซัลฟิวริก..... 88
- การย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์..... 89
ค การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย..... 91
ง กราฟมาตรฐาน..... 92
จ สูตรการคำนวณ..... 94
ประวัติผู้เขียน..... 97

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1-1	คุณลักษณะทางเคมีตามมาตรฐานของกรดมะนาว	8
1-2	ปริมาณและมูลค่าการนำเข้ากรดมะนาวของประเทศไทยระหว่างปี 2531-2539	11
3-1	น้ำหนักเซลล์แห้งของ *Candida oleophila* NN-39 เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อในระยะเวลาต่างๆ	19
3-2	ปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรด-ด่าง และปริมาณน้ำตาลที่เหลือ เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* NN-39 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวซึ่งมีแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์เป็นแหล่งคาร์บอนที่ระยะเวลาต่างๆ	21
3-3	เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก น้ำหนักเซลล์แห้ง ระดับความหนืด ค่าความเป็นกรด-ด่าง และน้ำตาลกลูโคสที่เหลือ เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* NN-39 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวที่มีการแปรผันปริมาณเริ่มต้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์	26
3-4	เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก น้ำหนักเซลล์แห้ง ระดับความหนืด ค่าความเป็นกรด-ด่าง และน้ำตาลกลูโคสที่เหลือเมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* NN-39 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวที่มีการแปรผันปริมาณเริ่มต้นของเกลือโซเดียมซัลเฟต	28
3-5	เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก น้ำหนักเซลล์แห้ง ระดับความหนืด ค่าความเป็นกรด-ด่าง และน้ำตาลกลูโคสที่เหลือ เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* NN-39 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวที่มีการแปรผันปริมาณเริ่มต้นของเกลือแคลเซียมคลอไรด์	31
3-6	เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก น้ำหนักเซลล์แห้ง ระดับความหนืด ค่าความเป็นกรด-ด่าง และน้ำตาลกลูโคสที่เหลือ เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* NN-39 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวที่มีการแปรผันปริมาณเริ่มต้นของเกลือแคลเซียมซัลเฟต	34

สารบัญตาราง(ต่อ)

ตารางที่ หน้า

3-7 เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก น้ำหนักเซลล์แห้ง ระดับความหนืด ค่าความเป็นกรด-ด่าง และน้ำตาลกลูโคสที่เหลือ เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* NN-39 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวที่มีการแปรผันระดับความเข้มของสารสีคล้ำ (Browning) ในสารละลายน้ำตาล..... 40

3-8 เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก น้ำหนักเซลล์แห้ง ระดับความหนืด ค่าความเป็นกรด-ด่าง และน้ำตาลกลูโคสที่เหลือ เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* NN-39 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวที่มีการแปรผันอัตราส่วนของสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดซัลฟิวริก (HPS) ต่อสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์ (HST)..... 42

3-9 เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก น้ำหนักเซลล์แห้ง ระดับความหนืด ค่าความเป็นกรด-ด่าง และน้ำตาลกลูโคสที่เหลือ เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* NN-39 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวเพื่อศึกษาผลของสารตกค้างในกากมันสำปะหลังที่สามารถกำจัดออกได้โดยการล้างน้ำต่อการผลิตกรดมะนาว.45

3-10 เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก น้ำหนักเซลล์แห้ง ระดับความหนืด ค่าความเป็นกรด-ด่าง และน้ำตาลกลูโคสที่เหลือ เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* NN-39 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวเพื่อศึกษาผลของกรดซัลฟิวรัสที่ตกค้างในกากมันสำปะหลัง..... 48

3-11 เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก น้ำหนักเซลล์แห้ง ระดับความหนืด ค่าความเป็นกรด-ด่าง และน้ำตาลกลูโคสที่เหลือ เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* NN-39 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวที่ใช้สารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดซัลฟิวริก หลังผ่านตัวกลางแลกเปลี่ยนประจุภาคชนิดต่าง ๆ..... 53

3-12 ปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก น้ำหนักเซลล์แห้ง ระดับความหนืด ค่าความเป็นกรด-ด่างและปริมาณน้ำตาลที่เหลือ เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* NN-39 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวซึ่งใช้สารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดซัลฟิวริกเป็นแหล่งคาร์บอนที่ระยะเวลาต่าง ๆของการหมักในระดับขวดเขย่า..... 56

สารบัญตาราง(ต่อ)

ตารางที่ หน้า

3-13 ปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก น้ำหนักเซลล์แห้ง ระดับความหนืด ค่าความเป็นกรด-ด่างและปริมาณน้ำตาลที่เหลือ เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* NN-39 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวซึ่งใช้สารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์เป็นแหล่งคาร์บอนในระยะเวลาต่าง ๆ ในระดับขวดเขย่า..... 60

3-14 ปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก น้ำหนักเซลล์แห้ง ระดับความหนืด ค่าความเป็นกรด-ด่างและปริมาณน้ำตาลที่เหลือเมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* NN-39 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวซึ่งใช้สารละลายน้ำตาลได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดซัลฟิวริกเป็นแหล่งคาร์บอนที่ระยะเวลาต่าง ๆของการหมัก ในระดับขวดเขย่า..... 61

3-15 ปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก น้ำหนักเซลล์แห้ง ระดับความหนืด ค่าความเป็นกรด-ด่างและปริมาณน้ำตาลที่เหลือเมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* NN-39 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวซึ่งใช้แป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์เป็นแหล่งคาร์บอนที่ระยะเวลาต่าง ๆของการหมักในระดับขวดเขย่า... 62

3-16 เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก และกรดฟิวมาริก ที่ระยะเวลาต่าง ๆของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* NN-39 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวที่มีการแปรผันแหล่งคาร์บอนในระดับขวดเขย่า..... 63

3-17 ปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก น้ำหนักเซลล์แห้ง ระดับความหนืด ค่าความเป็นกรด-ด่าง น้ำตาลกลูโคสที่เหลือ ค่า $Y_{p/s}$ $Y_{x/s}$ $Y_{p/x}$ ที่ระยะเวลาต่าง ๆของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* NN-39 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 5 ลิตร 67

3-18 ปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก น้ำหนักเซลล์แห้ง ระดับความหนืด ค่าความเป็นกรด-ด่าง น้ำตาลกลูโคสที่เหลือ ค่า $Y_{p/s}$ $Y_{x/s}$ $Y_{p/x}$ ที่ระยะเวลาต่าง ๆของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* NN-39 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยควบคุมความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสไว้ที่ประมาณ 50 กรัมต่อลิตร..... 71

3-19 การวิเคราะห์ความแปรปรวนในแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด..... 95

3-20 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของการออกแบบบล็อกเชิงสุ่ม..... 95

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

1-1 วัฏจักรเครปส์ หรือวัฏจักรกรดมะนาว..... 4

1-2 สูตรโครงสร้างกรดมะนาว..... 7

3-1 รูปแบบการเจริญของเชื้อ *Candida oleophila* NN-39 ในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ..... 11

3-2-ลักษณะการเจริญ ค่าความเป็นกรด-ด่าง การผลิตกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก ตลอดจนการใช้น้ำตาลของ *Candida oleophila* NN-39 เมื่อเลี้ยงในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาว ซึ่งมีแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยแล้วด้วยเอนไซม์เป็นแหล่งคาร์บอนที่ระยะเวลาต่าง ๆ..... 22

3-3 เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก น้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* NN-39 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวที่มีการแปรผันปริมาณเริ่มต้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ เมื่อใช้เวลาการหมัก 96ชั่วโมง..... 27

3-4 เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก น้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* NN-39 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวที่มีการแปรผันปริมาณเริ่มต้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ เมื่อใช้เวลาการหมัก 120 ชั่วโมง..... 27

3-5 เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก น้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* NN-39 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวที่มีการแปรผันปริมาณเริ่มต้นของเกลือโซเดียมซัลเฟตเมื่อใช้เวลาการหมัก 96 ชั่วโมง..... 29

3-6 เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก น้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* NN-39 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวที่มีการแปรผันปริมาณเริ่มต้นของเกลือโซเดียมซัลเฟตเมื่อใช้เวลาการหมัก 120 ชั่วโมง..... 29

3-7 เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก น้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* NN-39 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวที่มีการแปรผันปริมาณเริ่มต้นของเกลือแคลเซียมคลอไรด์เมื่อใช้เวลาการหมัก 96 ชั่วโมง..... 32

3-8 เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก น้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* NN-39 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวที่มีการแปรผันปริมาณเริ่มต้นของเกลือแคลเซียมคลอไรด์เมื่อใช้เวลาการหมัก 120 ชั่วโมง..... 32

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

3-9 เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก น้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* NN-39 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวที่มีการแปรผันปริมาณเริ่มต้นของเกลือแคลเซียมซัลเฟตเมื่อใช้เวลาการหมัก 96 ชั่วโมง..... 35

3-10 เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก น้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* NN-39 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวที่มีการแปรผันปริมาณเริ่มต้นของเกลือแคลเซียมซัลเฟตเมื่อใช้เวลาการหมัก 120 ชั่วโมง..... 35

3-11 เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก น้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* NN-39 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวที่มีการแปรผันระดับความเข้มของสารสีคล้ำ (Browning) ของสารละลายน้ำตาลที่ระยะเวลาการหมัก 96 ชั่วโมง..... 41

3-12 เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก น้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* NN-39 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวที่มีการแปรผันระดับความเข้มของสารสีคล้ำ (Browning) ของสารละลายน้ำตาลที่ระยะเวลาการหมัก 120 ชั่วโมง..... 41

3-13 เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก น้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* NN-39 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวที่มีการแปรผันอัตราส่วนของสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดซัลฟิวริกต่อสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์ที่ระยะเวลาการหมัก 96 ชั่วโมง..... 43

3-14 เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก น้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* NN-39 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวที่มีการแปรผันอัตราส่วนของสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดซัลฟิวริกต่อสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์ที่ระยะเวลาการหมัก 120 ชั่วโมง..... 43

3-15 เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก น้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* NN-39 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวเพื่อศึกษาผลของการลดสารตกค้างในกากมันสำปะหลังซึ่งสามารถกำจัดออกได้โดยการล้างน้ำต่อการผลิตกรดมะนาว ที่ระยะเวลาการหมัก 96 ชั่วโมง..... 46

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

3-16 เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก น้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* NN-39 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวเพื่อศึกษาผลของการลดสารตกค้างในกากมันสำปะหลังซึ่งสามารถกำจัดออกได้โดยการล้างน้ำต่อการผลิตกรดมะนาว ที่ระยะเวลาการหมัก 120 ชั่วโมง..... 46

3-17 เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก น้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* NN-39 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวเพื่อศึกษาผลของกรดซัลฟิวรัสที่อาจตกค้างในกากมันสำปะหลังต่อการผลิตกรดมะนาว ที่ระยะเวลาการหมัก 96 ชั่วโมง..... 50

3-18 เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก น้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* NN-39 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวเพื่อศึกษาผลของกรดซัลฟิวรัสที่อาจตกค้างในกากมันสำปะหลังต่อการผลิตกรดมะนาว ที่ระยะเวลาการหมัก 120 ชั่วโมง..... 51

3-19 เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก น้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* NN-39 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวที่ใช้สารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดซัลฟิวริกหลังผ่านตัวกลางแลกเปลี่ยนประจุภาคชนิดต่าง ๆที่ระยะเวลาการหมัก 96 ชั่วโมง..... 54

3-20 เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก น้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* NN-39 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวที่ใช้สารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดซัลฟิวริกหลังผ่านตัวกลางแลกเปลี่ยนประจุภาคชนิดต่าง ๆที่ระยะเวลาการหมัก 120 ชั่วโมง..... 54

3-21 ปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรด-ด่าง และปริมาณน้ำตาลที่เหลือเมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* NN-39 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวซึ่งใช้สารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดซัลฟิวริกเป็นแหล่งคาร์บอนที่ระยะเวลาต่าง ๆของการหมักในระดับขวดเขย่า..... 57

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

3-22 ปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก กรดฟิวมาริก เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* NN-39 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวซึ่งใช้สารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์ (HPE), สารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดซัลฟิวริก (HPS) และแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้ วยเอนไซม์ (HST) เป็นแหล่งคาร์บอน ที่ระยะเวลาต่าง ๆของการหมัก ในระดับขวดเขย่า..... 64

3-23 ปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรด-ด่าง และน้ำตาลกลูโคส ในระยะเวลาต่าง ๆ ของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* NN-39 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวซึ่งใช้สารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดซัลฟิวริกเป็นแหล่งคาร์บอน ในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร..... 68

3-24 ค่า $Y_{p/s}$ $Y_{x/s}$ $Y_{p/x}$ ที่ระยะเวลาต่าง ๆของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* NN-39 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 5 ลิตร... 69

3-25 ปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรด-ด่าง และน้ำตาลกลูโคส ในระยะเวลาต่าง ๆ ของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* NN-39 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวซึ่งใช้สารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดซัลฟิวริกเป็นแหล่งคาร์บอนโดยควบคุมความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสไว้ที่ประมาณ 50 กรัมต่อลิตร..... 72

3-26 ค่า $Y_{p/s}$ $Y_{x/s}$ $Y_{p/x}$ ที่ระยะเวลาต่าง ๆของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* NN-39 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยควบคุมระดับความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสไว้ที่ประมาณ 50 กรัมต่อลิตร..... 73

ง-1 กราฟมาตรฐานของกรดมะนาวในช่วงความเข้มข้น 0.0-5.0 กรัมต่อลิตร..... 92

ง-2 กราฟมาตรฐานของกรดไอโซซิตริกในช่วงความเข้มข้น 0.0-1.0 กรัมต่อลิตร..... 92

ง-3 กราฟมาตรฐานของน้ำตาลรีดิวซ์ในช่วงความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 0.0-1.0 กรัมต่อลิตร..... 93

ง-4 กราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคสในช่วงความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 0.0-0.2 กรัมต่อลิตร..... 93

คำย่อ

คำย่อ		คำอธิบาย
vvm	=	ปริมาณอากาศต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที
Yp/s	=	สัมประสิทธิ์ของผลผลิตกรดมะนาวเมื่อเทียบกับน้ำตาลกลูโคสที่ใช้
Yx/s	=	สัมประสิทธิ์ของมวลเซลล์เมื่อเทียบกับน้ำตาลกลูโคสที่ใช้
Yp/x	=	สัมประสิทธิ์ของผลผลิตกรดมะนาวเมื่อเทียบกับมวลเซลล์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย