บทที่ 3

ผลการทดลอง

1. <u>การศึกษาประสิทธิภาพในการผลิตกรดมะนาวของ *Candida oleophila* C-73</u>

ในงานวิจัยนี้ใช้ *Candida oleophila* C-73 เป็นสายพันธุ์ตั้งต้น ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ในปี พ.ศ.2535 โดย เรวดี เลิศไตรรักษ์ พบว่า สายพันธุ์นี้สามารถเจริญได้ดีใน นอร์มัล พาราฟฟินส์ และแป้งที่ย่อยแล้ว เพื่อใช้เป็นตัวควบคุมสำหรับเปรียบเทียบกับสายพันธุ์กลายพันธุ์ที่ได้ ดังนั้นจึงนำเชื้อสายพันธุ์ C-73 นี้มาทดสอบประสิทธิภาพการผลิตกรดมะนาวบนอาหารวุ้น และอาหารเหลวในระดับขวดเขย่า

1.1 <u>การผลิตกรดบนอาหารวุ้น</u>

เพาะเลี้ยง *Candida oleophila* สายพันธุ์ C-73 ลงบนอาหารวุ้นที่มีแคลเซี่ยมคาร์บอเนต ตามวิธีการข้อ 6.1 หลังจากบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ตรวจสอบความกว้างบริเวณใสและโคโลนี พบว่า ในจำนวน 100 ซ้ำ มีอยู่ 55 ซ้ำ ที่ให้ค่า potency index (ภาคผนวก จ 1) เท่ากับ 1.38 ดังแสดงในตารางที่ 3 ส่วนค่าเฉลี่ยของ potency index เท่ากับ 1.35 และมีค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (ภาคผนวก จ 4)เป็น 0.0373

ตารางที่ 3 ความถี่ของสายพันธุ์ *Candida oleophila* C-73 จำนวน 100 ซ้ำที่ให้ความกว้างบริเวณใสและความกว้างโคโลนีขนาดต่างๆ กัน

ความกว้างบริเวณใส	ความกว้างโคโลนี	ความกว้างบริเวณใส ความกว้างโคโลนี	ความถี่	เปอร์เซนต์
1.8	1.5	1.20	2	2
1.9	1.5	1.27	3	3

มีต่อ...

ตารางที่ 3 (ต่อ)

ความกว้างบริเวณใส	ความกว้างโคโลนี	ความกว้างบริเวณใส ความกว้างโคโลนี	ความถี่	เปอร์เซนต์
2.0	1.5	1.33	8	8
2.1	1.6	1.31	14	14
2.2	1.6	1.38	55	55
2.3	1.7	1.35	18	18

1.2 ผลผลิตกรดมะนาวในระดับขวดเขย่า

นำ *Candida oleophila* สายพันธุ์ C-73 เพาะเลี้ยงในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาว สูตรอาหาร PM1 (ภาคผนวก ก 2) ตามวิธีการทดลองข้อ 3.3 เก็บผลชั่วโมงที่ 96 วิเคราะห์ปริมาณกรดมะนาวในน้ำหมัก ด้วยวิธี HPLC ตามวิธีการทดลองข้อ 7.5 จากตัวอย่างจำนวน 5 ซ้ำ พบว่า ค่าเฉลี่ยของปริมาณกรดมะนาวและกรดไอโซซิตริกเท่ากับ 95.45±1.73 และ 18.43±1.83 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

2. ประสิทธิภาพการคัดเลือกสายพันธุ์ที่ผลิตกรดมะนาวสูงขึ้นในขั้นปฐมภูมิ เปรียบเทียบกับการวิเคราะห์ปริมาณกรดมะนาวด้วย เพนตะโบรโมอะซิโตน และ HPLC

หลังการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ จะต้องทำการคัดเลือกเพื่อให้ได้สายพันธุ์ใหม่ที่ผลิตกรดมะนาวสูงขึ้น โดยจะทำการคัดเลือกเป็น 2 ขั้นตอน คือ ขั้นปฐมภูมิและทุติยภูมิ ซึ่งการคัดเลือกในขั้นปฐมภูมิ จะใช้วิธีการตรวจหาปริมาณกรดอย่างคร่าวๆ สามารถทำได้คราวละมากๆ สะดวกและรวดเร็ว ส่วนการคัดเลือกขั้นทุติยภูมิ ทำโดยเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว แล้วนำน้ำหมักมาวิเคราะห์ปริมาณกรดมะนาว ด้วยวิธีที่ให้ผลถูกต้องแน่นอน ดังนั้นในการคัดเลือกสายพันธุ์ใหม่ วิธีที่ใช้ตรวจสอบในขั้นปฐมภูมิ จะต้องให้ผลที่มีความ

สัมพันธ์กับผลที่ได้จากขั้นทุติยภูมิ จึงต้องทำการทดสอบเพื่อหาความสัมพันธ์ของวิธีการที่ใช้ในการคัดเลือกทั้งสองขั้น

การคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ เพื่อตรวจสอบการผลิตกรดอย่างคร่าวๆ สามารถทำได้บนอาหารวุ้นที่มีอินดิเคเตอร์อยู่ ซึ่งประสิทธิภาพการคัดเลือกจะขึ้นอยู่กับอินดิเคเตอร์ที่ใช้ สารที่นิยมใช้ ได้แก่ โบรโมครีซอลกรีน (Foster and Davis,1949;Lvova et al., 1980) และแคลเซียมคาร์บอเนต (Banno et al.,1971;Nout,1972) ในการทดลองนี้จะเลือกใช้ แคลเซี่ยมคาร์บอเนต เนื่องจากสารนี้ไม่เป็นอันตรายต่อเซลล์ ให้บริเวณใสที่ชัดเจน สามารถเก็บโคโลนีที่ให้บริเวณใสกว้างได้ทันที สะดวก และสารนี้ยังใช้ในการเพาะเลี้ยงขั้นทุติยภูมิด้วย ดังนั้นในการเปรียบเทียบจะใช้ค่า อัตราส่วนของเส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณใสต่อเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนี หรือเรียกว่า Potency Index (ภาคผนวก จ 1) แต่การเกิดบริเวณใสจะเกิดจากกรดชนิดต่างๆ ที่เชื้อผลิตขึ้นไม่เฉพาะกับกรดมะนาว และความกว้างของบริเวณใสจะขึ้นกับขนาดของโคโลนีด้วย อย่างไรก็ตามการที่เชื้อผลิตกรดมะนาวเป็นผลิตภัณฑ์หลัก จึงสามารถใช้วิธีนี้ในการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิได้ จากนั้นจึงทำการคัดเลือกขั้นทุติยภูมิ ซึ่งวิธีการที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณกรดมะนาวในน้ำหมักมีอยู่หลายวิธี โดยทั่วไปจะใช้วิธีเพนตะโบรโมอะซิโตน เนื่องจากวิเคราะห์ได้ครั้งละหลายตัวอย่าง สะดวกและรวดเร็ว แต่การวิเคราะห์ด้วยHPLC จะให้ผลถูกต้องแน่นอน และสามารถวิเคราะห์กรดอื่นๆ ได้ด้วย ดังนั้นในการทดลองนี้จะใช้วิธีการวิเคราะห์ทั้งสอง โดยใช้วิธีเพนตะ-โบรโมอะซิโตน วิเคราะห์ปริมาณกรดมะนาวในน้ำหมักที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว ครั้งที่ 1 แล้วจึงคัดเลือกสายพันธุ์ที่ให้กรดมะนาวสูงขึ้น มาเพาะเลี้ยง ครั้งที่ 2 ทำการวิเคราะห์กรดมะนาวและกรดไอโซซิตริก ด้วยวิธี HPLC เพื่อเป็นการทดสอบว่าวิธีวิเคราะห์ทั้งสองให้ผลที่สอดคล้องกัน และสัมพันธ์กับวิธีการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ จึงทำการเปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาวในน้ำหมักที่วิเคราะห์ด้วยวิธีทั้งสอง และหาความสัมพันธ์ของปริมาณกรดมะนาวที่ได้กับอัตราส่วนของเส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณใสต่อเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนี (potency index)

ทำการสุ่มโคโลนีที่ผ่านการกลายพันธุ์แล้ว 50 โคโลนี เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร PM3 (ภาคผนวก ก 2) ทำการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ และทุติยภูมิ ตามวิธีการทดลองข้อ 6 ได้ข้อมูลดังแสดงในตารางที่ 4 พบว่า ค่า potency index จะอยู่ในช่วง 1.20–1.67 ส่วนปริมาณกรดมะนาวที่ได้จะแตกต่างกันมาก ตั้งแต่ 80 ถึง 140 กรัมต่อลิตร เขียนกราฟ

แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณกรดมะนาว ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีเพนตะโบรโม–อะซิโตน กับ HPLC ได้ดังกราฟรูปที่ 7 จะเห็นว่าวิธีการวิเคราะห์ทั้งสอง มีความสัมพันธ์ไปในทางเดียวกัน และมีความสัมพันธ์กันมาก โดยดูได้จากค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient) (ภาคผนวก จ 3) ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.9948 ดังนั้น จึงการวิเคราะห์กรดมะนาวด้วยวิธีเพนตะโบรโมอะซิโตน ในครั้งที่ 1 เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ที่ผลิตกรดมะนาวสูง แล้วใช้วิธี HPLC เพื่อดูการผลิตกรดมะนาวและกรดไอโซซิตริก จึงเป็นวิธีที่ถูกต้องและเหมาะสม สำหรับความสัมพันธ์ของค่า potency index กับปริมาณกรดมะนาวที่วิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ได้ดังรูปที่ 8 จะเห็นว่ามีความสัมพันธ์ไปในทางเดียวกัน มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ เท่ากับ 0.6204 ซึ่งพอที่จะยอมรับ สำหรับใช้ค่า potency index ในการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ

ตารางที่ 4 ค่า potency index เปรียบเทียบกับปริมาณกรดมะนาวที่วิเคราะห์ด้วยวิธีเพนตะโบรโมอะซิโตน และ HPLC ของสายพันธุ์ทดสอบ 50 สายพันธุ์

รหัสสายพันธุ์	ความกว้างบริเวณใส * / ความกว้างโคโลนี	กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	
		เพนตะโบรโมอะซิโตน	HPLC
Test-1	1.67	80.19	79.22
Test-2	1.67	143.40	142.99
Test-3	1.67	139.23	140.47
Test-4	1.66	87.56	86.29
Test-5	1.65	129.06	128.30
Test-6	1.65	126.20	125.35
Test-7	1.65	126.20	124.63
Test-8	1.65	120.53	120.08

มีต่อ...

ตารางที่ 4 (ต่อ)

รหัสสายพันธุ์	ความกว้างบริเวณใส* / ความกว้างโคโลนี	กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	
		เพนตะโบรโมอะซิโตน	HPLC
Test-9	1.61	118.74	119.33
Test-10	1.61	117.59	118.10
Test-11	1.60	117.59	116.87
Test-12	1.60	117.59	115.89
Test-13	1.55	115.20	114.41
Test-14	1.55	102.99	103.86
Test-15	1.55	103.26	104.53
Test-16	1.52	88.85	87.03
Test-17	1.50	80.19	81.39
Test-18	1.50	113.26	110.13
Test-19	1.50	113.26	112.92
Test-20	1.50	102.99	100.16
Test-21	1.47	117.59	116.23
Test-22	1.47	86.05	87.12
Test-23	1.47	126.20	124.54
Test-24	1.45	86.05	85.14
Test-25	1.45	103.26	103.13
Test-26	1.45	113.26	114.62
Test-27	1.45	103.26	101.14

มีต่อ...

I 18๗๗๒๗๖๐

ตารางที่ 4 (ต่อ)

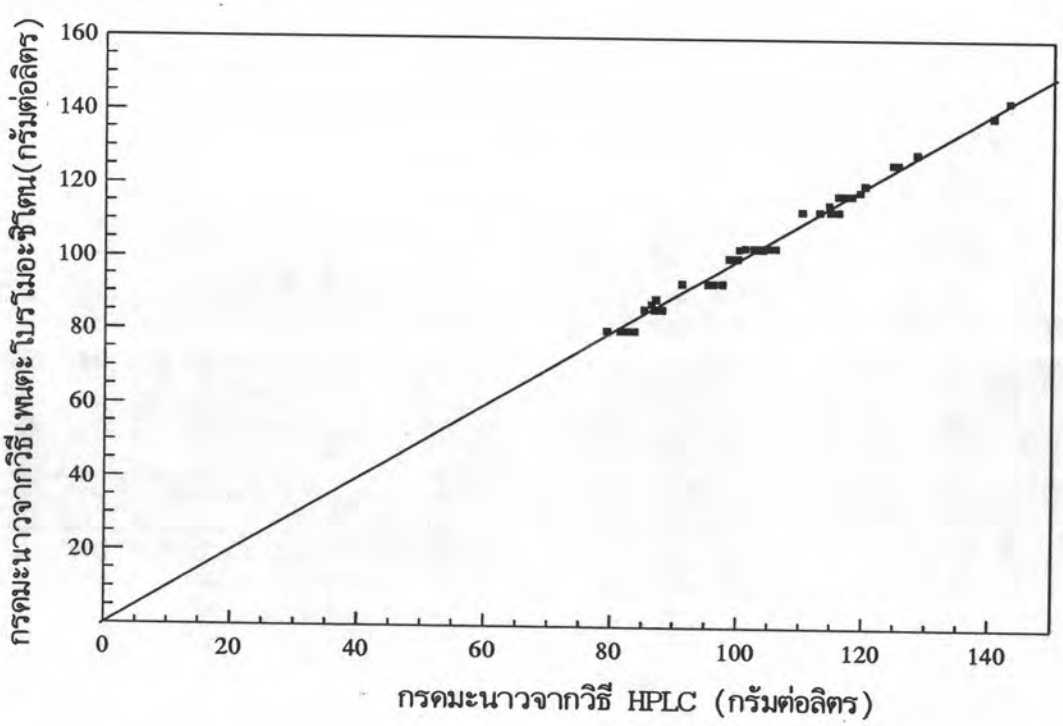
รหัสสายพันธุ์	ความกว้างบริเวณใส* / ความกว้างโคโลนี	กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	
		เพนตะโบรโมอะซิโตน	HPLC
Test-28	1.43	117.59	116.74
Test-29	1.43	113.26	115.93
Test-30	1.38	103.26	105.84
Test-31	1.38	103.26	102.45
Test-32	1.38	102.99	103.31
Test-33	1.38	93.22	95.17
Test-34	1.38	103.26	105.67
Test-35	1.38	103.26	104.94
Test-36	1.35	103.26	104.10
Test-37	1.35	102.99	103.59
Test-38	1.34	93.22	96.08
Test-39	1.34	93.22	91.15
Test-40	1.34	100.39	99.78
Test-41	1.34	100.39	98.56
Test-42	1.34	86.05	88.03
Test-43	1.32	93.22	97.47
Test-44	1.30	100.39	99.92
Test-45	1.30	80.19	82.10

มีต่อ...

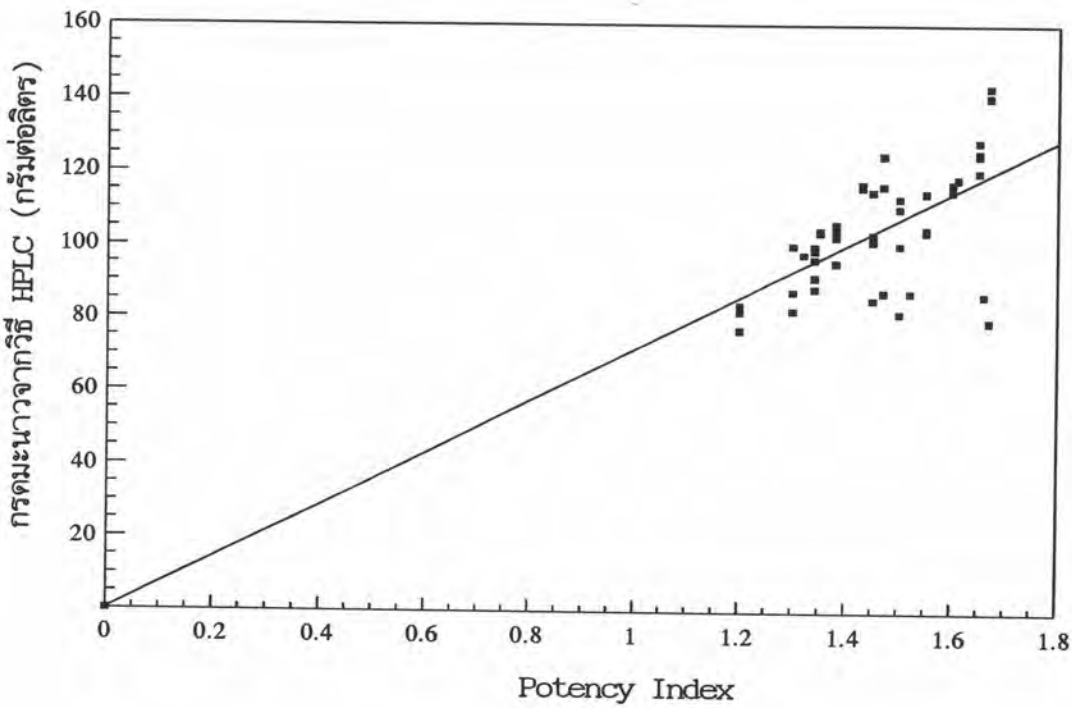
ตารางที่ 4 (ต่อ)

รหัสสายพันธุ์	ความกว้างบริเวณใส* / ความกว้างโคโลนี	กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	
		เพนตะโบรโมอะซิโตน	HPLC
Test-46	1.30	86.05	87.21
Test-47	1.20	80.19	83.54
Test-48	1.20	80.19	82.52
Test-49	1.20	86.05	86.79
Test-50	1.20	80.19	81.73

*ค่าเฉลี่ยจาก 5 ซ้ำ



รูปที่ 7 ความสัมพันธ์ของปริมาณกรดมะนาวที่ได้จากการวิเคราะห์ ด้วยวิธีเพนตะโบรโมอะซิโตน กับ HPLC



รูปที่ 8 ความสัมพันธ์ของค่า potency index กับปริมาณกรดมะนาวที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC

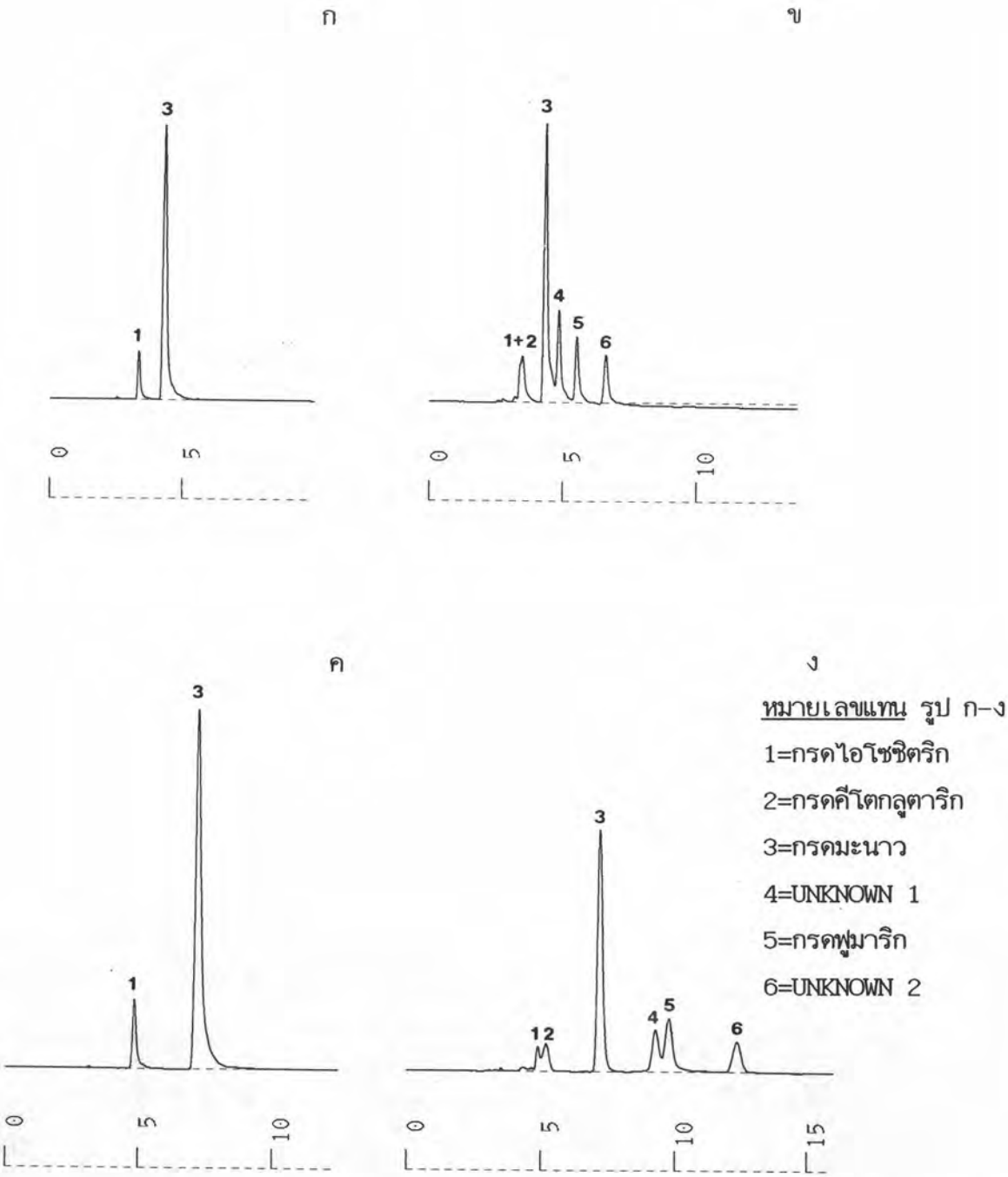
3. <u>การปรับปรุงวิธีวิเคราะห์ปริมาณกรดมะนาว และกรดไอโซซิตริก โดยวิธีไฮเพอร์-ฟอแมนซ์ลิควิดโครมาโตกราฟฟี(High Performance Liquid Chromatography)</u>

เป็นการปรับปรุงเพื่อให้เหมาะสมกับงาน โดยการหาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกกรดที่เป็นองค์ประกอบในน้ำหมัก เพื่อทำการวิเคราะห์ทั้งชนิดและปริมาณได้อย่างถูกต้องแน่นอน ซึ่งมีผู้รายงานอยู่มาก โดยตัวอย่างที่วิเคราะห์จะแตกต่างกัน ดังตัวอย่างในตารางที่ 1 จะเห็นว่าคอลัมน์ที่ใช้จะเป็น รีเวอร์สเฟส (reverse phase) C8 หรือ C18 ซึ่งจะมีความยาวที่แตกต่างกันไป สำหรับสารละลายตัวพาเป็น ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ที่มีองค์ประกอบของสารแตกต่างกัน และปรับความเป็นกรดด่างด้วยกรดฟอสฟอริก(H_3PO_4) ส่วน

เครื่องตรวจวัดนิยมใช้เป็นแบบแสงอุลตราไวโอเลต โดยวัดที่ความยาวคลื่น 210 หรือ 214 นาโนเมตร

3.1 <u>การหาสภาวะที่เหมาะสม</u>

วิธีการนี้ดัดแปลงจากวิธีของ Bevilacqua and Califano (1991) โดยเปรียบเทียบระหว่างคอลัมน์รีเวอร์สเฟส C8 กับ C18 มีความยาว 25 เซนติเมตร และเส้นผ่าศูนย์กลาง 4.6 มิลลิเมตร โดยใช้สภาวะที่ Bevilacqua และ Califano รายงานไว้ ดังนี้ สารละลายตัวพาเป็นสารละลายไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟตเข้มข้นร้อยละ 0.5 น้ำหนักต่อปริมาตร แล้วเติมอะซิโตไนทริลให้มีความเข้มข้นร้อยละ 0.4 ปริมาตรต่อปริมาตร จากนั้นปรับค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 2.24 ด้วยกรดฟอสฟอริก และเครื่องตรวจวัดเป็นแบบแสงอุลตราไวโอเลต ความยาวคลื่น 214 นาโนเมตร ส่วนอัตราการไหลเปลี่ยนเป็น 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ฉีดสารละลายผสมของกรดมะนาวกับกรดไอโซซิตริก เปรียบเทียบกับน้ำหมัก ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 9 พบว่า คอลัมน์ทั้ง 2 ชนิด สามารถแยกสารละลายมาตรฐานได้ดี โดยแยกได้ 2 พีค(peak) พีคหมายเลข 1 เป็นกรดไอโซซิตริก ส่วนพีคหมายเลข 2 เป็นกรดมะนาว ซึ่งพีคที่ได้จากการแยกด้วยคอลัมน์ C8 จะมีเวลาที่อยู่ในคอลัมน์ (retention time) น้อยกว่าเมื่อใช้คอลัมน์ C18 ดังรูปที่ 9ก และ 9ค ส่วนการแยกน้ำหมัก เมื่อใช้คอลัมน์ C18 โครมาโตแกรมที่ได้จะมี 6 พีค ในขณะที่ C8 แยกได้เพียง 5 พีค โดยพีคที่ 1 เป็นพีคของกรดไอโซซิตริกรวมกับพีคใกล้เคียง ดังรูปที่ 9ข และ 9ง ส่วนการแยกน้ำหมักด้วยคอลัมน์ C18 จะได้พีคที่แยกออกจากกันอย่างชัดเจน ดังนั้นคอลัมน์ C18 จึงเหมาะสมที่จะใช้ในการวิเคราะห์สารในน้ำหมัก อย่างไรก็ตามคอลัมน์ C18 ยังไม่สามารถแยกพีคหมายเลข 1 ซึ่งเป็นกรดไอโซซิตริกออกจากพีคใกล้เคียง จึงทำการปรับปรุงส่วนอื่นๆ ต่อไป



รูปที่ 9 โครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน และน้ำหมัก เมื่อใช้คอลัมน์ C8 และ C18

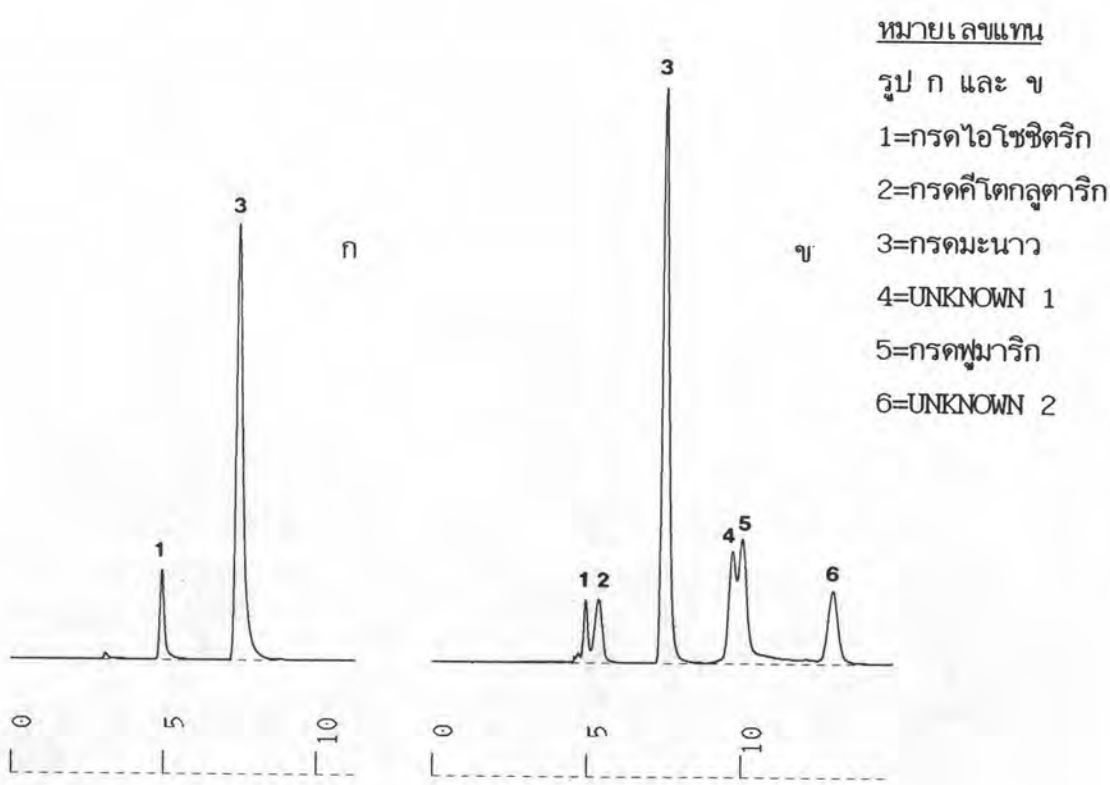
ก) สารมาตรฐานผสมกรดมะนาว และกรดไอโซซิตริก เมื่อใช้คอลัมน์ C8

ข) น้ำหมักของ C-73 ที่ 96 ชั่วโมงของการหมัก เมื่อใช้คอลัมน์ C8

ค) สารมาตรฐานผสมกรดมะนาว และกรดไอโซซิตริก เมื่อใช้คอลัมน์ C18

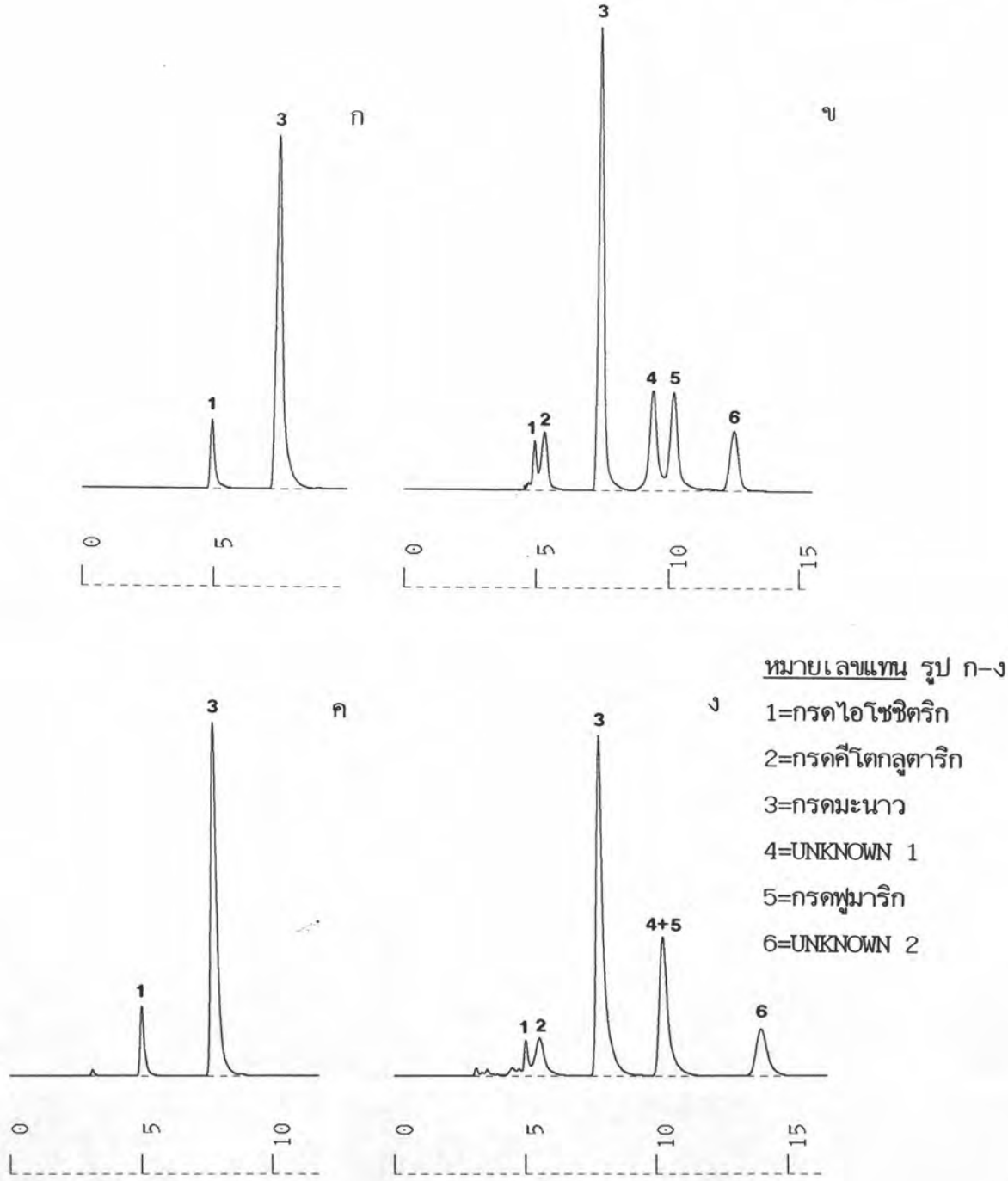
ง) น้ำหมักของ C-73 ที่ 96 ชั่วโมงของการหมัก เมื่อใช้คอลัมน์ C18

เมื่อพิจารณาสารละลายตัวพา ดังแสดงในตารางที่ 1 จะเห็นว่าแต่ละรายงานมีความแตกต่างของค่าความเป็นกรดด่าง และการเติมสารบางอย่าง เช่น อะซิโตไนทริล (acetonitrile) แอมโมเนียมซัลเฟต เป็นต้น จึงทำการทดลองไม่เติมอะซิโตไนทริล ส่วนสภาวะอื่นๆ ยังคงเหมือนเดิม และใช้คอลัมน์ C18 ได้ผลดังรูปที่ 10 จะเห็นว่าลักษณะโครมาโตแกรมของสารละลายมาตรฐาน (รูปที่ 10ก) แยกได้ 2 พีคเหมือนเมื่อเติมอะซิโตไนทริล ส่วนโครมาโตแกรมของน้ำหมัก (รูปที่ 10ข) เมื่อเปรียบเทียบกับโครมาโตรแกรมที่ใช้สารละลายตัวพาที่เติมอะซิโตไนทริล (รูปที่ 9ง) จะเห็นว่าการแยกของพีคที่ 1 และ 2 ดีขึ้นเล็กน้อย แต่พีคที่ 4 และ 5 แยกได้ไม่ดี เนื่องจากพีคที่ 1 เป็นกรดไอโซซิตริกที่ต้องการวิเคราะห์ จึงเลือกสารละลายตัวพาที่ไม่เติมอะซิโตไนทริลในการวิเคราะห์



รูปที่ 10 โครมาโตแกรมสารมาตรฐาน (10ก) และน้ำหมัก (10ข) เมื่อใช้สารละลายตัวพาที่ไม่เติมอะซิโตไนทริล

จากตารางที่ 1 จะเห็นว่าค่าความเป็นกรดด่างของสารละลายตัวพา มีความแตกต่างกัน จึงทำการทดลองเปลี่ยนค่าความเป็นกรดด่างจาก 2.24 เป็น 2.40 และ 2.00 ส่วนสภาวะอื่นเหมือนเดิม และใช้คอลัมน์ C18 กับสารละลายตัวพาที่ไม่เติมอะซิโต-ไนทริล ได้โครมาโตแกรมรูปที่ 11 พบว่า ที่ความเป็นกรดด่าง 2.00 และ 2.40 โครมาโตแกรมของสารมาตรฐานจะมี 2 พีค แยกจากกันอย่างชัดเจน ส่วนโครมาโตแกรมของน้ำหมัก เมื่อใช้สารละลายตัวพาที่มีความเป็นกรดด่าง 2.40 จะแยกได้ 5 พีค ในขณะที่ความเป็นกรดด่าง 2.00 จะแยกได้ 6 พีค แยกจากกันดีกว่าที่สภาวะอื่น โดยพีคที่ 3,4, 5 และ 6 แยกออกจากกันอย่างชัดเจน แต่พีคที่ 1 และ 2 ยังแยกกันไม่ดี ดังนั้นจึงทดลองเพิ่มอุณหภูมิของคอลัมน์เป็น 40 องศาเซลเซียส ได้ผลดังรูปที่ 12 พบว่า การแยกพีคทั้ง 6 ของน้ำหมัก แยกออกจากกันได้ดีกว่าสภาวะอื่นๆที่ทดลองมา สำหรับความยาวคลื่นที่ตรวจวัด ทำการทดสอบโดยนำสารละลายกรดมะนาว สารละลายกรดไอโซซิตริก สารละลายผสมของกรดมะนาวกับกรดไอโซซิตริก และน้ำหมัก มาหาสเปคตรัม (spectrum) โดยสแกน (scan) ที่ความยาวคลื่น 190–400 นาโนเมตร ได้ผลดังรูปที่ 13 จะเห็นว่าสารละลายกรดมะนาวความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 216 นาโนเมตร ส่วนสารละลายกรดไอโซซิตริกความเข้มข้น 3 กรัมต่อลิตร มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 208 นาโนเมตร สำหรับสารละลายผสมของกรดมะนาวกับกรดไอโซซิตริก มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด ที่ความยาวคลื่น 214 นาโนเมตร และค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดของน้ำหมัก เท่ากับ 214 นาโนเมตร ดังนั้นจึงเลือกใช้เครื่องตรวจวัดที่เป็นแสงอุลตราไวโอเลตความยาวคลื่น 214 นาโนเมตร



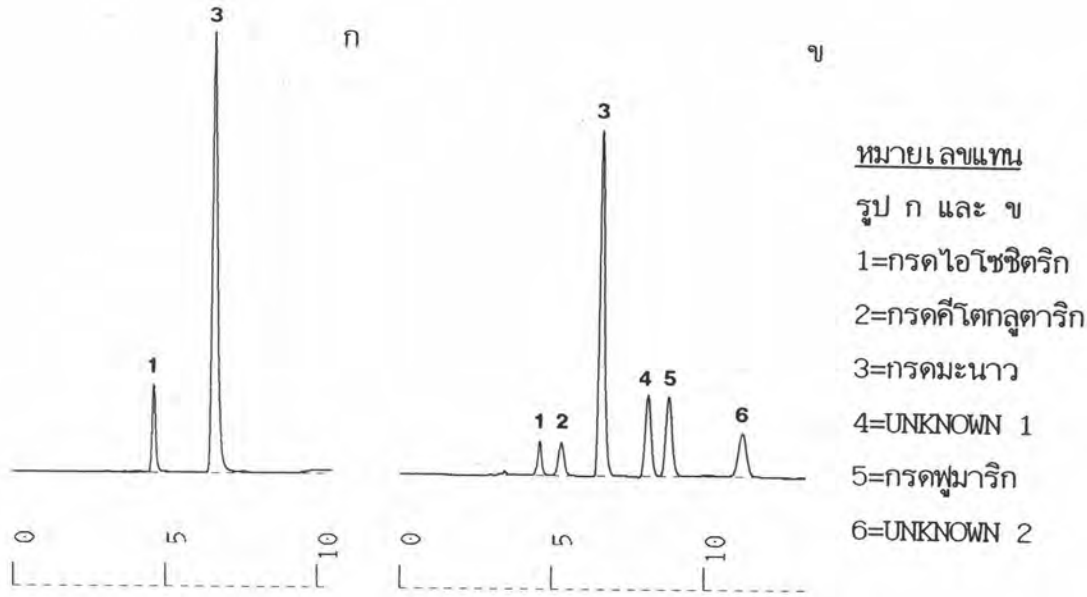
รูปที่ 11 โครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน และน้ำหมัก เมื่อใช้สารละลายตัวพา ที่มีค่าความเป็นกรดด่าง 2.40 และ 2.00

ก) สารมาตรฐานผสมกรดมะนาว และกรดไอโซซิตริก เมื่อใช้สารละลายตัวพา pH=2.00

ข) น้ำหมักของ C-73 ที่ 96 ชั่วโมงของการหมัก เมื่อใช้สารละลายตัวพา pH=2.00

ค) สารมาตรฐานผสมกรดมะนาว และกรดไอโซซิตริก เมื่อใช้สารละลายตัวพา pH=2.40

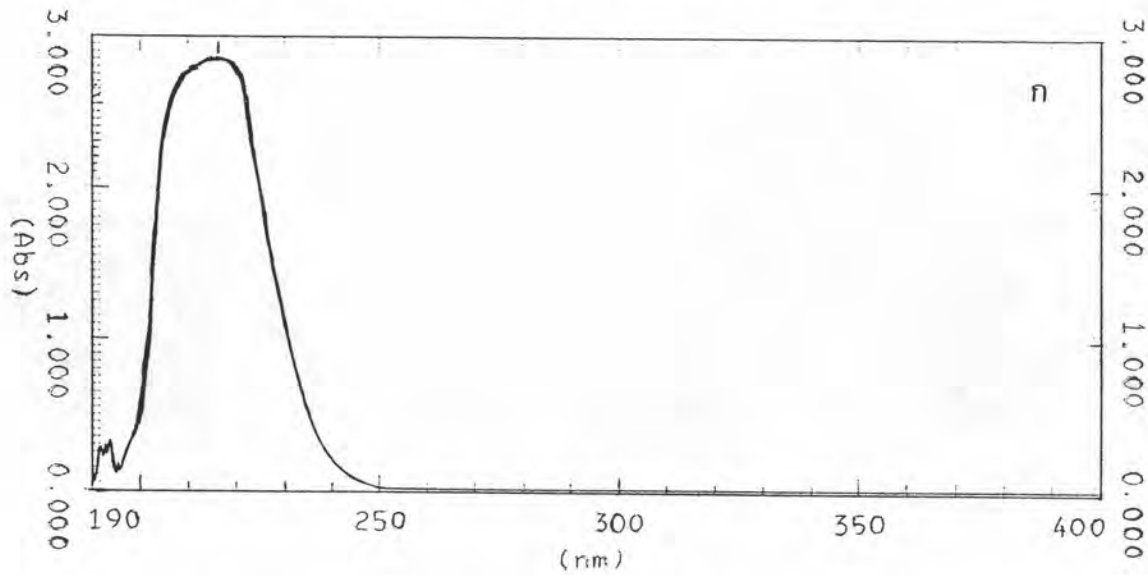
ง) น้ำหมักของ C-73 ที่ 96 ชั่วโมงของการหมัก เมื่อใช้สารละลายตัวพา pH=2.40



รูปที่ 12 โครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน และน้ำหมัก เมื่อเพิ่มอุณหภูมิคอลัมน์เป็น 40 องศาเซลเซียส

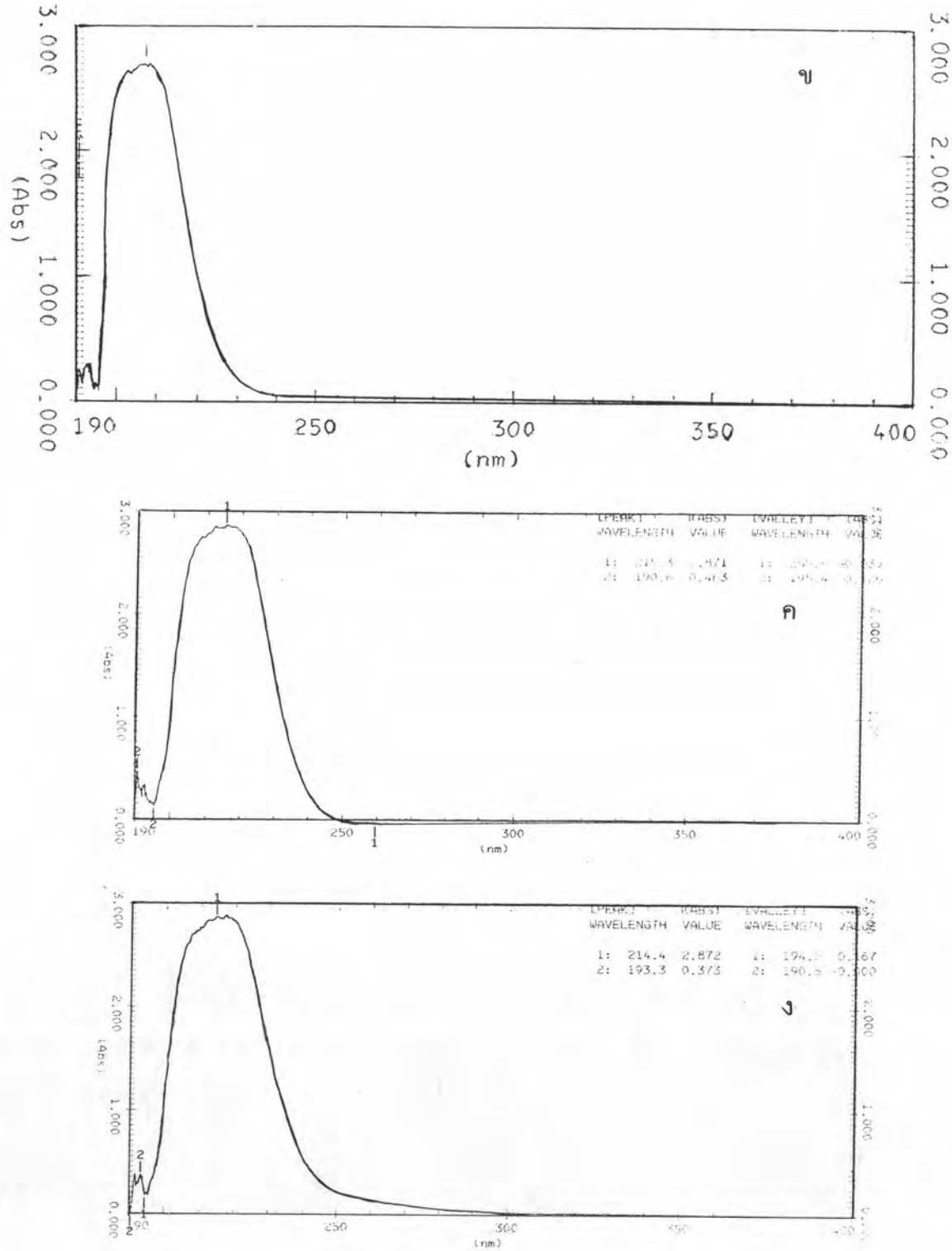
ก) สารละลายมาตรฐานผสมของกรดมะนาว และกรดไอโซซิตริก

ข) น้ำหมักของ C-73 ที่ 96 ชั่วโมงของการหมัก



รูปที่ 13 สเปคตรัมของสารละลายมาตรฐาน และน้ำหมักที่ความยาวคลื่น 190-400 นาโนเมตร

ก) สารละลายกรดมะนาว ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร



รูปที่ 13(ต่อ) สเปคตรัมของสารละลายมาตรฐาน และน้ำหมักที่ความยาวคลื่น 190–400 นาโนเมตร

ข) สารละลายกรดไอโซซิตริก ความเข้มข้น 3 กรัมต่อลิตร

ค) สารละลายผสมกรดมะนาว และกรดไอโซซิตริก

ง) น้ำหมักของ C–73 ที่ 96 ชั่วโมงของการหมัก

3.2 <u>การหาชนิดของกรดในน้ำหมักและสารละลายมาตรฐานเปรียบเทียบภายใน</u>

ทำการทดลองโดยฉีดสารละลายของกรดชนิดต่างๆ ในสภาวะที่เหมาะสม เพื่อดูเวลาที่อยู่ในคอลัมน์ (retention time) เปรียบเทียบระหว่างสารละลายกรดมาตรฐาน กับน้ำหมัก ลักษณะโครมาโตแกรมของสารละลายผสมกรดชนิดต่างๆ แสดงในรูปที่ 14 จะเห็นว่าสามารถแยกกรดชนิดต่างๆ ที่ใช้ทดสอบได้เป็นอย่างดี ส่วนเวลาที่อยู่ในคอลัมน์ แสดงในตารางที่ 5 เมื่อเปรียบเทียบเวลาที่อยู่ในคอลัมน์ของสารละลายกรดมาตรฐานกับน้ำหมัก พบว่า ในน้ำหมักมี กรดไอโซซิตริก,กรดคีโตกลูตาริก (α-ketoglutaric acid) กรดมะนาว,กรดฟูมาริก(fumaric acid) และกรดที่ไม่ทราบอีก 2 ชนิด สำหรับสารมาตรฐานเปรียบเทียบภายในที่เหมาะสม ได้แก่ กรดทาร์ทาริก เนื่องจากเป็นสารที่ไม่อยู่ในวัฏจักรเครปส์ และมีเวลาที่อยู่ในคอลัมน์ 3.75 นาที ซึ่งห่างจากของกรดไอโซซิตริก 0.85 นาที ทำการทดสอบโดยเติมกรดทาร์ทาริกลงในน้ำหมัก ฉีดเข้าเครื่อง HPLC ได้โครมาโตแกรม ดังในรูปที่ 15 จะเห็นว่า พีคของกรดทาร์ทาริกไม่ซ้อนทับกับพีคที่มีในน้ำหมัก จึงใช้เป็นสารละลายมาตรฐานเปรียบเทียบภายในได้

ตารางที่ 5 เวลาที่อยู่ในคอลัมน์ของกรดมาตรฐานชนิดต่างๆ และน้ำหมัก

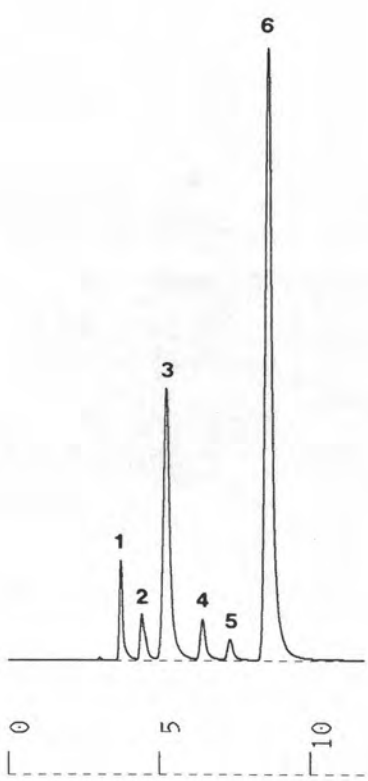
ชนิดของกรด	เวลาที่อยู่ในคอลัมน์ (นาที)	
	สารมาตรฐาน	น้ำหมัก
กรดทาร์ทาริก	3.75	-
กรดไอโซซิตริก	4.60	4.59
กรดคีโตกลูตาริก	5.29	5.30
กรดอะซิตริก	5.56	-
กรดมาลิอิก	6.08	-
กรดมะนาว	6.61	6.60

มีต่อ...

ตารางที่ 5 (ต่อ)

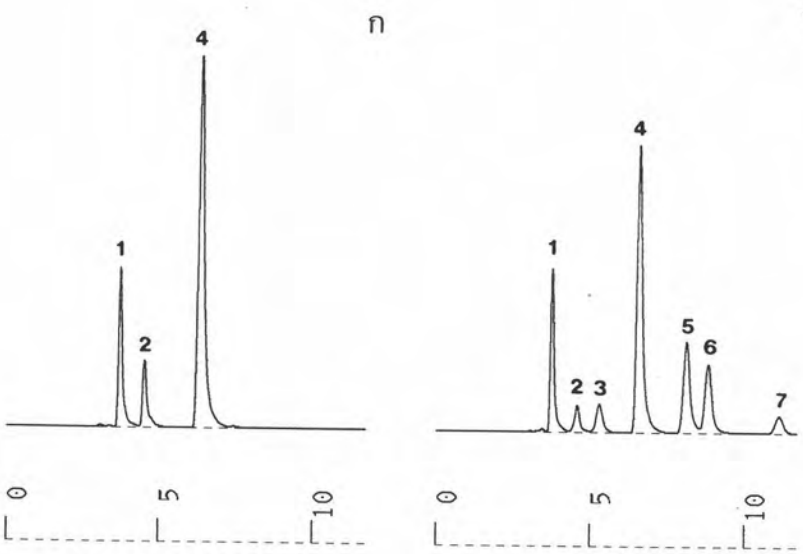
ชนิดของกรด	เวลาที่อยู่ในคอลัมน์ (นาที)	
	สารมาตรฐาน	สารในน้ำหมัก
กรดซัคซินิก	7.59	-
กรดฟูมาริก	8.83	8.84
UNKNOWN 1	-	8.15
UNKNOWN 2	-	11.22

หมายเหตุ - หมายถึง ตรวจไม่พบ



หมายเลขแทน
1=กรดทาร์ทาริก
2=กรดไอโซซิตริก
3=กรดคีโตกลูตาริก
4=กรดมะนาว
5=กรดซัคซินิก
6=กรดฟูมาริก

รูปที่ 14 โครมาโตแกรมของสารละลายผสมกรดชนิดต่างๆ



หมายเลขแทน
รูป ก และ ข
1=กรดทาร์ทาริก
2=กรดไอโซซิตริก
3=กรดคีโตกลูตาริก
4=กรดมะนาว
5=UNKNOWN 1
6=กรดฟูมาริก
7=UNKNOWN 2

รูปที่ 15 โครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน และน้ำหมัก ที่เติมกรดทาร์ทาริก เป็นสารมาตรฐานเปรียบเทียบภายใน

ก) สารละลายผสมของกรดมะนาว และกรดไอโซซิตริก

ข) น้ำหมักของ C-73 ที่ 96 ชั่วโมงของการหมัก

4. เปรียบเทียบวิธีการกลายพันธุ์ด้วยแสงอุลตราไวโอเลต และสารเคมี NTG เพื่อเลือกใช้เป็นวิธีเริ่มต้นในการปรับปรุงสายพันธุ์ *Candida oleophila* C-73

4.1 การกลายพันธุ์ด้วยแสงอุตราไวโอเลต และการคัดเลือกสายพันธุ์

4.1.1 การหาเวลาการฉายแสงอุลตราไวโอเลตที่เหมาะสม ในการชักนำเซลล์ของ *Candida oleophila* C-73 ให้เกิดการกลายพันธุ์

การกลายพันธุ์ด้วยแสงอุลตราไวโอเลตเป็นวิธีชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ที่นิยมใช้กันมาก เนื่องจากง่าย สะดวกและปลอดภัยในการใช้งาน ส่วนใหญ่ใช้ germicidal lamp ซึ่งเป็นหลอดไฟเมอคิวรี่ที่ปล่อยรังสีความยาวคลื่น 2537°A ซึ่งใกล้เคียงกับค่าการดูดกลืนแสงของกรดนิวคลีอิก จึงสามารถชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ แต่ยังขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง เช่น ระยะเวลาที่ได้รับแสง ระยะทางระหว่างแหล่งกำเนิดแสงกับเซลล์ ความหนาแน่นของเซลล์ อายุและสภาพการเจริญของเซลล์ เป็นต้น สำหรับการกลายพันธุ์ยีสต์เพื่อเพิ่มผลผลิตกรดมะนาว มีผู้รายงานระยะทางระหว่างแหล่งกำเนิดแสงกับเซลล์เท่ากับ 30 เซนติเมตร และหลอดมีกำลังงาน 15-30 วัตต์ ส่วนระยะเวลาที่ใช้ในการฉายแสงจะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับ สายพันธุ์และวิธีการ(Hamissa et al.,1982; Suzuki,et al.,1974;Wojtatowicz,et al.,1993) ดังนั้นจึงต้องแปรผันเวลาการฉายแสงอุลตราไวโอเลต เพื่อหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการชักนำให้ได้สายพันธุ์ใหม่ที่ต้องการ

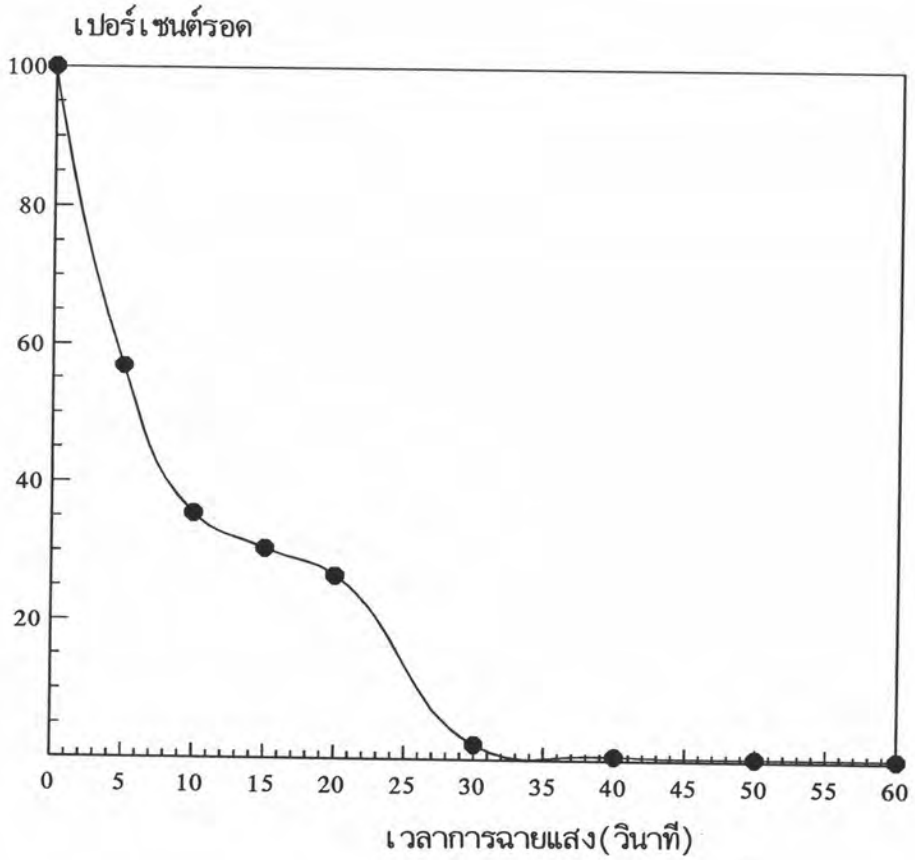
งานวิจัยนี้ได้ชักนำให้เซลล์ของ *Candida oleophila* C-73 ซึ่งเป็นสายพันธุ์เดิม ให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยแสงอุลตราไวโอเลตตามวิธีการทดลองในข้อ 5.2 หลังจากฉายแสงอุลตราไวโอเลตแล้ว บ่มในที่มืด ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีแล้วคำนวณเปอร์เซนต์การรอด ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 6 นำไปเขียนกราฟได้ดังรูปที่ 16 จะเห็นว่าเซลล์มีการตายเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วเมื่อฉายแสงอุลตราไวโอเลตไป 5 วินาที แล้วการตายจะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จากนั้นสุ่มโคโลนีที่ผ่านการฉายแสงแต่ละเวลามาทำการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิตามวิธีการทดลองในข้อ 6.1 หลังจากทำ

การคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ พบว่า ที่เวลาการฉายแสงเป็น 15, 20, 30, 40, 50 วินาที มีสายพันธุ์ใหม่ที่ให้ค่า potency index สูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น ซึ่งจะต้องนำสายพันธุ์ใหม่ทั้ง 18 สายพันธุ์ไปทำการคัดเลือกขั้นทุติยภูมิต่อไป

ตารางที่ 6 เปอร์เซนต์รอดตายภายหลังการฉายแสงอุลตราไวโอเลตที่เวลาต่างๆ เพื่อชักนำให้ *Candida oleophila* C-73 เกิดการกลายพันธุ์ และจำนวนโคโลนี ที่คัดเลือกขั้นปฐมภูมิแล้วให้ค่า potency index สูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น

เวลาการฉายแสง (วินาที)	เปอร์เซนต์รอดของเซลล์	การคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ		
		จำนวนโคโลนีที่ทดสอบ	จำนวนสายพันธุ์ที่มีค่า potency index สูงขึ้น	เปอร์เซนต์*
0	100	300	0	0
5	56.82	300	0	0
10	35.45	300	0	0
15	30.45	300	3	1.00
20	26.55	300	5	1.67
30	2.20	300	6	2.00
40	0.61	300	3	1.00
50	0.44	300	1	0.33
60	0.36	300	0	0

*เปอร์เซนต์สายพันธุ์ที่ให้ค่า potency index สูงขึ้น



รูปที่ 16 ความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซนต์รอดของ *Candida oleophila* สายพันธุ์ C-73 กับระยะเวลาในการฉายแสงอุลตราไวโอเลต เพื่อให้เกิดการกลายพันธุ์

4.1.2 <u>การคัดเลือกขั้นทุติยภูมิของเชื้อสายพันธุ์ใหม่ที่ผ่านการฉายแสงอุลตราไวโอเลต</u>

จากตารางที่ 6 ได้เชื้อสายพันธุ์ใหม่ 18 สายพันธุ์ จึงนำเชื้อทั้งหมดมาทดสอบการผลิตกรดมะนาวในอาหารเหลว เพื่อดูว่าเชื้อสายพันธุ์ที่ได้จากการฉายแสงอุลตราไวโอเลตที่เวลาใด ให้ผลผลิตกรดมะนาวสูงสุด

หลังจากเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวเพื่อผลิตกรดมะนาวสูตรอาหาร PM1 (ภาคผนวก ก 2) ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 7 พบว่าเชื้อ *Candida oleophila* สายพันธุ์ C-73 มีผลผลิตเท่ากับ 94.61 กรัมต่อลิตร ส่วนเชื้อสายพันธุ์ใหม่ที่คัดเลือกไว้ 18 สายพันธุ์ มีเพียง 7 สายพันธุ์ที่ให้ผลผลิตกรดมะนาวสูงกว่าสายพันธุ์เดิม ได้แก่ สายพันธุ์ U-13, U-21,U-26,U-36,U-39,U-40 และ U-45 โดยสายพันธุ์ U-40 เป็นสายพันธุ์ใหม่ที่ให้ผลผลิตกรดมะนาวสูงถึง 111.84 กรัมต่อลิตร ซึ่งสายพันธุ์ทั้ง 7 เป็นสายพันธุ์ที่ผ่านการฉายแสงอุลตราไวโอเลตเป็นเวลา 20, 30 หรือ 40 วินาที ดังแสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 ค่า potency index และปริมาณกรดมะนาว (ครั้งที่ 1) ของ *Candida oleophila* สายพันธุ์ C-73 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ดั้งต้น และเชื้อสายพันธุ์ใหม่ที่คัดเลือกได้ เก็บผลชั่วโมงที่ 96 (วิเคราะห์ผลด้วยวิธีเพนตะโบรโมอะซีโตน)

รหัสสายพันธุ์	ความกว้างบริเวณใส* / ความกว้างโคโลนี	เวลาที่ผ่านการฉายแสง UV (วินาที)	กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)
C-73	1.33	0	97.85
U-4	1.38	15	94.61
U-9	1.42	15	86.29
U-12	1.43	15	91.55
U-13	1.43	20	105.30
U-19	1.40	20	96.83
U-21	1.43	20	105.30
U-24	1.40	20	94.61
U-26	1.43	20	107.61

มีต่อ...

ตารางที่ 7 (ต่อ)

รหัสสายพันธุ์	ความกว้างบริเวณใส* / ความกว้างโคโลนี	เวลาที่ผ่านการฉายแสง UV (วินาที)	กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)
U-28	1.42	30	93.24
U-30	1.38	30	94.61
U-31	1.42	30	96.83
U-35	1.40	30	94.61
U-36	1.46	30	107.61
U-39	1.42	30	107.61
U-40	1.42	40	111.84
U-45	1.40	40	105.30
U-46	1.43	40	96.83
U-47	1.42	50	86.29

*ค่าเฉลี่ยจาก 5 ซ้ำ

เพื่อตรวจสอบความสามารถในการผลิตกรดมะนาว และกรดไอโซซิตริกของเชื้อสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ทั้ง 7 สายพันธุ์ จากตารางที่ 7 จึงทำการเพาะเลี้ยงอีก 2 ครั้ง ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 8 และ 9 จะเห็นว่าสายพันธุ์ U-40 ผลิตกรดมะนาวได้สูงกว่าสายพันธุ์อื่นๆ โดยผลิตได้ 112.94 และ 111.51 กรัมต่อลิตร ซึ่งใกล้เคียงกับการทดสอบครั้งที่ 1 แต่มีบางสายพันธุ์มีแนวโน้มการผลิตกรดมะนาวลดลง เช่น สายพันธุ์ U-13 และ U-45 ส่วนการผลิตกรดไอโซซิตริกของแต่ละสายพันธุ์ยังไม่ค่อยแตกต่างกันอย่างเด่นชัด นอกจากนั้นน้ำตาลกลูโคสที่เหลือจะสอดคล้องกับผลผลิตกรดมะนาว เมื่อคิดค่าร้อยละของผลผลิต($\%Y_{p/s}$) ซึ่งเป็นอัตราส่วนของปริมาณกรดมะนาวต่อน้ำตาลกลูโคสที่ใช้

(ภาคผนวก จ 2) จะเห็นว่า ในการเพาะเลี้ยงครั้งที่ 2 ค่า $\%Y_{p/s}$ ที่ได้จากเชื้อสายพันธุ์ใหม่จะสูงกว่าของสายพันธุ์เดิม แต่ในครั้งที่ 3 บางสายพันธุ์จะให้ค่านี้ลดลงอย่างเห็นได้ชัด ส่วนสายพันธุ์ U-40 ลดลงเล็กน้อย โดยมีค่าเท่ากับ 59.08 และ 58.53 ซึ่งยังคงสูงกว่าสายพันธุ์อื่นๆ

ตารางที่ 8 ปริมาณการผลิตกรดมะนาว จากการคัดเลือกขั้นทุติยภูมิ (ครั้งที่ 2) ของ *Candida oleophila* สายพันธุ์ C-73 ซึ่งเป็นสายพันธุ์เดิม และเชื้อสายพันธุ์ใหม่ที่มีผลผลิตกรดมะนาวมากกว่าสายพันธุ์เดิม เก็บผลชั่วโมงที่ 96 (วิเคราะห์ผลด้วยวิธี HPLC)

รหัสสายพันธุ์	เวลาที่ผ่านการฉายแสง UV (วินาที)	กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	กรดไอโซซิตริก (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลกลูโคสที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	ผลผลิต* ($\%Y_{p/s}$)
C-73	0	96.83	18.15	25.30	55.43
U-13	20	107.38	15.32	12.34	57.22
U-21	20	108.20	14.45	13.11	57.90
U-26	20	109.83	14.86	12.85	58.69
U-36	30	110.48	16.44	10.28	58.23
U-39	30	108.05	14.81	11.35	57.28
U-40	40	112.94	15.65	8.83	59.08
U-45	40	106.70	15.35	13.11	57.09

$$*\text{ผลผลิต}(\%Y_{p/s}) = \frac{\text{กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)} \times 100}{\text{น้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น} - \text{น้ำตาลกลูโคสที่เหลือ}}$$

ตารางที่ 9 ปริมาณการผลิตกรดมะนาว จากการคัดเลือกขั้นทุติยภูมิ (ครั้งที่ 3) ของ *Candida oleophila* สายพันธุ์ C-73 ซึ่งเป็นสายพันธุ์เดิม และเชื้อสายพันธุ์ใหม่ที่มีผลผลิตกรดมะนาวมากกว่าสายพันธุ์เดิม เก็บผลชั่วโมงที่ 96 (วิเคราะห์ผลด้วยวิธี HPLC)

รหัสสายพันธุ์	เวลาที่ผ่านการฉายแสง UV (วินาที)	กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	กรดไอโซซิตริก (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลกลูโคสที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	ผลผลิต* ($\%Y_{p/s}$)
C-73	0	95.87	17.80	23.57	54.34
U-13	20	100.36	14.61	13.11	53.70
U-21	20	105.31	13.52	12.45	56.15
U-26	20	106.13	15.50	15.11	57.40
U-36	30	108.14	15.73	13.11	57.86
U-39	30	107.41	16.68	12.45	57.27
U-40	40	111.51	16.37	9.48	58.53
U-45	40	98.21	14.67	15.11	53.12

$$^{*}\text{ผลผลิต}(\%Y_{p/s}) = \frac{\text{กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร) X 100}}{\text{น้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น-น้ำตาลกลูโคสที่เหลือ}}$$

4.2 การกลายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG และการคัดเลือกสายพันธุ์

4.2.1 การหาความเข้มข้น NTG ที่เหมาะสมในการชักนำเซลล์ของ *Candida oleophila* C-73 ให้เกิดการกลายพันธุ์

ความเข้มข้นของ NTG เป็นปัจจัยที่สำคัญในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์เพื่อให้ได้เชื้อสายพันธุ์ใหม่ที่มีคุณสมบัติตามต้องการ สำหรับการกลายพันธุ์ยีสต์เพื่อเพิ่มผลผลิตกรดมะนาว มีผู้รายงานความเข้มข้นของ NTG ที่ใช้แตกต่างกันมาก อยู่ในช่วง 1.7-2.7 มิลลิโมลาร์ ขึ้นอยู่กับสภาวะและสายพันธุ์ของเชื้อที่ใช้ แต่เปอร์เซนต์รอดของเซลล์ที่ใช้จะใกล้เคียงกันประมาณ 10-30 เปอร์เซนต์ (Hamissa et al.,1982; Matsuoka et al.,1980; Wojtatowicz et al.,1991) ดังนั้นจึงแปรผันความเข้มข้นของ NTG เพื่อหาความเข้มข้นที่ทำให้เกิดเปอร์เซนต์รอดของเซลล์ที่เหมาะสม

ในการทดลองชักนำเซลล์ของ *Candida oleophila* C-73 ให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG ที่ความเข้มข้นสุดท้ายของ NTG เท่ากับ 0.034,0.068, 0.340,0.680,1.020,1.360 มิลลิโมลาร์ ทำการทดลองตามวิธีการทดลองข้อ 5.1 หลังจากบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีที่เจริญ (เซลล์ที่รอด) คำนวณเปอร์เซนต์รอดตายได้ดังตารางที่ 10 และกราฟที่รูปที่ 17

จากการใช้ NTG ชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ พบว่า NTG สามารถทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะโคโลนีที่แตกต่างไปจากสายพันธุ์เดิมได้ เช่น ลักษณะผิวหน้าโคโลนีย่นมาก ขนาดโคโลนีเล็ก มีสีเปลี่ยนไป เป็นต้น เมื่อนำยีสต์จากโคโลนีที่มีลักษณะเปลี่ยนไปดังกล่าวมาคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ จะให้บริเวณใสรอบๆโคโลนีน้อยกว่าสายพันธุ์เดิมมาก บางโคโลนีไม่เกิดบริเวณใสรอบๆโคโลนี ส่วนโคโลนีที่เกิดบริเวณใสรอบๆโคโลนีกว้างกว่าสายพันธุ์เดิม จะเป็นพวกที่มีลักษณะโคโลนีเหมือนสายพันธุ์เดิม

จากกราฟรูปที่ 17 เมื่อใช้ความเข้มข้นของ NTG สูงกว่า 0.340 มิลลิ-โมลาร์ เปอร์เซนต์รอดของเซลล์จะลดลงอย่างรวดเร็ว และที่ความเข้มข้นของ NTG เป็น 0.680 มิลลิโมลาร์ ทำให้เกิดเปอร์เซนต์รอดของเซลล์เท่ากับ 7.14 หลังจากทำการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ พบว่า ที่เปอร์เซนต์รอดของเซลล์เป็น 7.14 และ 0.08 จะได้เปอร์เซนต์ของสายพันธุ์ที่ให้ค่า potency index สูงกว่าที่จุดอื่นๆ ซึ่งจะต้องนำไปทำ

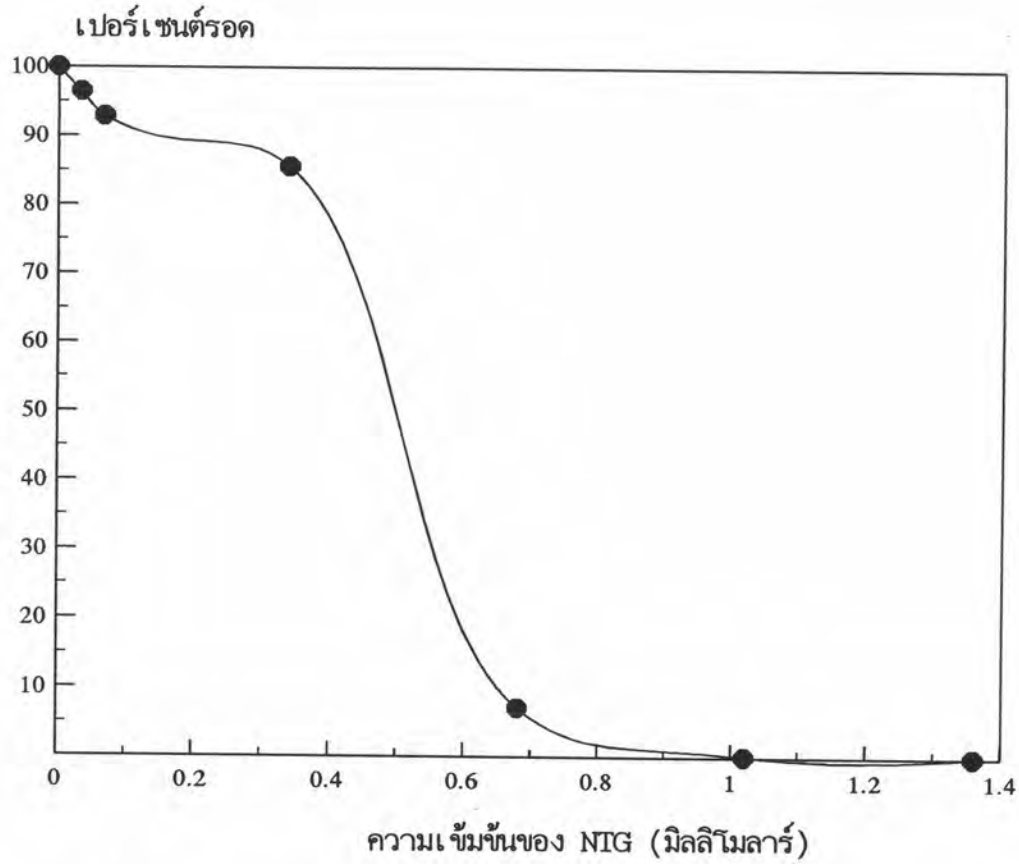
การคัดเลือกขั้นทุติยภูมิต่อไป

ตารางที่ 10 เปอร์เซนต์รอดตายภายหลังการเติม NTG ความเข้มข้นต่างๆ เพื่อชักนำให้ *Candida oleophila* C-73 เกิดการกลายพันธุ์ และจำนวนโคโลนีที่คัดเลือกขั้นปฐมภูมิแล้วให้บริเวณใสรอบๆโคโลนี กว้างกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น

ความเข้มข้นของ NTG (มิลลิโมลาร์)	เปอร์เซนต์รอดของเซลล์	การคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ		
		จำนวนโคโลนีที่ทดสอบ	จำนวนสายพันธุ์ที่มีค่า potency index สูงขึ้น	เปอร์เซนต์*
0	100	300	0	0
0.034	96.43	300	0	0
0.068	92.86	300	2	0.67
0.340	85.57	300	5	1.67
0.680	7.14	300	8	2.67
1.020	0.08	300	6	2.00
1.360	0.009	300	1	0.33

*เปอร์เซนต์สายพันธุ์ที่ให้ค่า potency index สูงขึ้น

จากตารางที่ 10 ได้เชื้อสายพันธุ์ใหม่ที่ให้กรดเพิ่มขึ้น 22 สายพันธุ์ จึงนำเชื้อทั้งหมดมาทดสอบการผลิตกรดมะนาวในอาหารเหลว เพื่อดูว่าเชื้อสายพันธุ์ใหม่ที่ได้จากการกลายพันธุ์ด้วย NTG ที่ความเข้มข้นใด ให้ผลผลิตกรดมะนาวได้สูงสุด



รูปที่ 17 ความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซนต์รอดของ *Candida oleophila* สายพันธุ์ C-73 กับความเข้มข้นของสารเคมี NTG

4.2.2 <u>การคัดเลือกขั้นทุติยภูมิของเชื้อสายพันธุ์ใหม่ที่สามารถผลิตกรดมะนาวได้สูง</u>

จากตารางที่ 10 เก็บเชื้อสายพันธุ์ใหม่จำนวน 22 สายพันธุ์ ตามวิธีการเก็บรักษาในวิธีการทดลองข้อ 3.1 แล้วนำมาเพาะเลี้ยงตามวิธีการทดลองในข้อ 3.3 เพื่อทำการคัดเลือกขั้นทุติยภูมิตามวิธีการทดลองข้อ 6.2 ต่อไป

หลังจากเพาะเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์ใหม่ทั้ง 22 สายพันธุ์ ในอาหารเพื่อผลิตกรดมะนาวสูตรอาหาร PM1 ครั้งที่ 1 เก็บผลที่ 96 ชั่วโมง วิเคราะห์หาปริมาณกรดมะนาวโดยวิธีเพนตะโบรโมอะซีโตน ตามวิธีการทดลองข้อ 7.3 ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 11 พบว่าเชื้อ *Candida oleophila* สายพันธุ์ C-73 มีผลผลิตกรดมะนาวในชั่วโมงที่ 96 ของการเพาะเลี้ยงเท่ากับ 98.35 กรัมต่อลิตร ส่วนเชื้อสายพันธุ์ใหม่ที่คัดเลือกไว้ 22

สายพันธุ์มีเพียง 8 สายพันธุ์ ที่ให้ผลผลิตกรดมะนาวสูงกว่าสายพันธุ์เดิม โดยสายพันธุ์ N-57 เป็นสายพันธุ์ใหม่ที่ให้ผลผลิตกรดมะนาวสูงถึง 112.06 กรัมต่อลิตร และมีค่า potency index เป็น 1.47 จากตารางที่ 11 จะเห็นได้ว่า สายพันธุ์ที่ผ่านการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วย NTG ความเข้มข้น 0.680 มิลลิโมลาร์ ส่วนใหญ่สามารถผลิตกรดมะนาวเพิ่มมากขึ้น ดังนั้นความเข้มข้นของ NTG ที่เหมาะสมในการชักนำให้ *Candida oleophila* คือ 0.680 มิลลิโมลาร์

ตารางที่ 11 ค่า potency index และปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้ (ครั้งที่ 1) ของ *Candida oleophila* สายพันธุ์ C-73 และสายพันธุ์ใหม่ที่คัดเลือกได้ เก็บผลชั่วโมงที่ 96 (วิเคราะห์ผลด้วยวิธีเพนตะโบรโมอะซิโตน)

รหัสสายพันธุ์	ความกว้างบริเวณใส* / ความกว้างโคโลนี	ความเข้มข้นของ NTG ที่ใช้ (มิลลิโมลาร์)	กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)
C-73	1.36	0	96.35
N-40	1.40	1.360	99.86
N-45	1.45	1.020	110.03
N-46	1.42	1.020	96.83
N-47	1.47	1.020	110.84
N-50	1.42	1.020	98.35
N-53	1.40	1.020	99.86
N-56	1.45	0.680	107.08
N-57	1.47	0.680	112.06
N-58	1.47	0.680	107.03
N-60	1.45	0.680	105.54

มีต่อ...

ตารางที่ 11 (ต่อ)

รหัสสายพันธุ์	ความกว้างบริเวณใส* / ความกว้างโคโลนี	ความเข้มข้นของ NIG ที่ใช้ (มิลลิโมลาร์)	กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)
N-63	1.45	0.680	98.35
N-65	1.45	0.680	98.35
N-66	1.47	0.680	108.97
N-68	1.42	0.680	110.42
N-70	1.45	0.340	96.83
N-71	1.42	0.340	98.35
N-74	1.45	0.340	98.35
N-77	1.47	0.340	99.86
N-78	1.40	0.340	98.35
N-80	1.42	0.068	98.35
N-85	1.42	6.068	91.35

*ค่าเฉลี่ยจาก 5 ซ้ำ

นำสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้จากตารางที่ 11 เปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิตกรดมะนาวของเชื้อสายพันธุ์ใหม่ทั้ง 8 สายพันธุ์ กับสายพันธุ์เริ่มต้นอีก 2 ครั้ง จึงเพาะเลี้ยงในอาหารเพื่อผลิตกรดมะนาว ครั้งที่ 2 และ 3 ภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงเดียวกัน เก็บผลที่ 96 ชั่วโมง วิเคราะห์หาปริมาณกรดมะนาว, กรดไอโซซิตริก (ด้วยวิธี HPLC) และน้ำตาลรีดิวซ์ ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 12 และ 13 จะเห็นว่าเชื้อสายพันธุ์ N-57 ผลิตกรดมะนาวได้สูงกว่าสายพันธุ์อื่นๆ อย่างชัดเจน นั่นคือสามารถผลิตกรดมะนาวได้ 113.23 และ 114.27 กรัมต่อลิตร คิดเป็นผลผลิต($\%Y_{p/s}$) (ภาคผนวก จ 2) เท่ากับ 59.32 และ 59.81

ตารางที่ 12 ปริมาณกรดมะนาวและกรดไอโซซิตริกที่ผลิตได้ น้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือในน้ำหมักจากการคัดเลือกขั้นทุติยภูมิ(ครั้งที่ 2) ของ *Candida oleophila* สายพันธุ์ C-73 และสายพันธุ์ใหม่ที่ผ่านการคัดเลือกครั้งที่ 1 เก็บผลชั่วโมงที่ 96 (วิเคราะห์ผลด้วยวิธี HPLC)

รหัสสายพันธุ์	กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	กรดไอโซซิตริก (กรัมต่อลิตร)	กรดมะนาวต่อกรดไอโซซิตริก	น้ำตาลกลูโคสที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	ผลผลิต* ($\%Y_{p/s}$)
C-73	96.42	17.02	5.67	23.43	54.61
N-45	106.76	13.88	7.69	17.81	58.60
N-47	108.63	14.85	7.32	15.32	58.82
N-56	105.35	13.83	7.62	16.43	57.39
N-57	113.23	14.41	7.86	9.12	59.32
N-58	104.14	13.12	7.94	16.84	56.86
N-60	108.61	13.43	8.09	14.62	58.59
N-66	109.93	13.36	8.23	13.15	58.83
N-68	110.95	14.62	7.59	11.31	58.80

* ผลผลิต($\%Y_{p/s}$) = $\frac{\text{กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร) X 100}}{\text{น้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น-น้ำตาลกลูโคสที่เหลือ}}$

ตารางที่ 13 ปริมาณกรดมะนาว และกรดไอโซซิตริกที่ผลิตได้ น้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือในน้ำหมัก จากการคัดเลือกขั้นทุติยภูมิ(ครั้งที่ 3) ของ *Candida oleophila* สายพันธุ์ C-73 และสายพันธุ์ใหม่ที่ผ่านการคัดเลือกครั้งที่ 1 เก็บผลชั่วโมงที่ 96 (วิเคราะห์ผลด้วยวิธี HPLC)

รหัสสายพันธุ์	กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	กรดไอโซซิตริก (กรัมต่อลิตร)	กรดมะนาวต่อกรดไอโซซิตริก	น้ำตาลกลูโคสที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	ผลผลิต* ($\%Y_{p/s}$)
C-73	99.41	18.22	5.46	20.54	55.39
N-45	107.38	14.46	7.43	17.78	58.93
N-47	109.45	15.38	7.12	15.19	59.22
N-56	104.53	13.27	7.88	17.94	57.42
N-57	114.27	15.25	7.49	8.93	59.81
N-58	103.43	13.54	7.64	14.86	55.87
N-60	105.62	13.63	7.75	15.51	57.25
N-66	108.15	14.46	7.48	13.42	57.96
N-68	107.76	14.13	7.63	12.38	57.44

$$^{*}\text{ผลผลิต}(\%Y_{p/s}) = \frac{\text{กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร) X 100}}{\text{น้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น-น้ำตาลกลูโคสที่เหลือ}}$$

จากการกลายพันธุ์ *Candida oleophila* C-73 ด้วยแสงอุลตราไวโอเลต และ NTG เมื่อเปรียบเทียบกันจะเห็นว่า สายพันธุ์ที่ได้จากการกลายพันธุ์ด้วยแสงอุลตราไวโอเลตมี 7 สายพันธุ์ที่ผลิตกรดมะนาวได้สูงกว่าสายพันธุ์ C-73 (ตารางที่ 7) หลังจากเพาะเลี้ยงอีก 2 ครั้ง มีอยู่ 5 สายพันธุ์ที่ผลิตกรดมะนาวลดลง 3-8 กรัมต่อลิตร แสดงให้เห็นว่าการผลิตกรดมะนาวมีแนวโน้มไม่คงที่ จึงไม่เหมาะสมที่จะใช้เป็นวิธีเริ่มต้นในการปรับปรุงสายพันธุ์ ดังนั้นจึงเลือกสายพันธุ์ N-57 เป็นสายพันธุ์ตั้งต้นในการกลายพันธุ์ต่อไป

5. การชักนำให้ *Candida oleophila* เกิดการกลายพันธุ์ซ้ำ ด้วยสารเคมี NTG

จากผลการทดลองที่ 4 ได้คัดเลือกสายพันธุ์ N-57 ซึ่งมีประสิทธิภาพการผลิตกรดมะนาว 112.06, 113.23 และ 114.24 กรัมต่อลิตร ซึ่งสูงกว่าสายพันธุ์ C-73 อย่างชัดเจน เนื่องจากการทดลองที่ 4 เมื่อใช้ความเข้มข้นของ NTG เป็น 0.680 มิลลิโมลาร์ จะได้เปอร์เซนต์สายพันธุ์ที่ให้กรดเพิ่มขึ้นสูงกว่าที่ความเข้มข้นอื่นๆและสามารถคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพการผลิตรกรดมะนาวสูงขึ้นได้ ดังนั้นจึงใช้ความเข้มข้นของ NTG เป็น 0.680 มิลลิโมลาร์ สำหรับการกลายพันธุ์ซ้ำโดยใช้สายพันธุ์ N-57 เป็นสายพันธุ์ตั้งต้น จากนั้นคัดเลือกสายพันธุ์ที่ให้ผลผลิตกรดมะนาวเพิ่มขึ้น ตามวิธีในข้อ 6.1 พบว่าเปอร์เซนต์รอดใกล้เคียงกับสายพันธุ์ C-73 ซึ่งเป็นสายพันธุ์เดิม แต่เปอร์เซนต์สายพันธุ์ที่ให้ค่า potency index สูงขึ้น จะลดลงมาก(จากการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ) ดังแสดงในตารางที่ 14

ตารางที่ 14 เปอร์เซนต์รอด และจำนวนสายพันธุ์ใหม่ที่มีประสิทธิภาพการผลิตกรดสูงขึ้นจากการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ

เปอร์เซนต์รอด	จำนวนโคโลนีที่ทดสอบ	จำนวนสายพันธุ์ที่ให้ค่า potency index เพิ่มขึ้น	เปอร์เซนต์*
5.62	2000	20	1.0

*เปอร์เซนต์สายพันธุ์ที่ให้ค่า potency index สูงขึ้น

จากตารางที่ 14 ได้เชื้อสายพันธุ์ใหม่ที่ผ่านการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ 20 สายพันธุ์ จึงนำเชื้อทั้งหมดมาทดสอบประสิทธิภาพการผลิตกรดมะนาวในอาหารเหลว เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ที่เหมาะสมสำหรับการผลิตในสภาวะที่กำหนดต่อไป

หลังจากเพาะเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์ใหม่ ในอาหารเหลวเพื่อผลิตกรดมะนาว เก็บผลชั่วโมงที่ 96 วิเคราะห์หาปริมาณกรดมะนาวและกรดไอโซซิตริก โดยวิธีเพนตะโบรโมอะซิโตน ตามวิธีการทดลองข้อ 7.4 ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 15 พบว่าเชื้อสายพันธุ์ใหม่ที่คัดเลือกไว้ 20 สายพันธุ์ มีเพียง 8 สายพันธุ์ ที่ให้ผลผลิตกรดมะนาวสูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น ได้แก่ สายพันธุ์ NN-1, NN-3, NN-16, NN-22, NN-32, NN-39, NN-40 และ NN-41 โดยสายพันธุ์ NN-1 เป็นสายพันธุ์ใหม่ที่ให้ผลผลิตกรดมะนาวสูงถึง 121.42 กรัมต่อลิตร ส่วนการผลิตกรดไอโซซิตริกของเชื้อสายพันธุ์ใหม่ยังใกล้เคียงกับสายพันธุ์ตั้งต้น

ตารางที่ 15 ค่า potency index และปริมาณกรดมะนาว (ครั้งที่ 1) ของ *Candida oleophila* สายพันธุ์ N-57 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ตั้งต้น และเชื้อสายพันธุ์ใหม่ที่คัดเลือกได้ เก็บผลชั่วโมงที่ 96(วิเคราะห์ด้วยวิธีเพนตะโบรโมอะซิโตน)

รหัสสายพันธุ์	ความกว้างบริเวณใส* / ความกว้างโคโลนี	กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)
N-57	1.47	113.26
NN-1	1.54	121.42
NN-3	1.50	117.59
NN-8	1.53	110.12
NN-9	1.53	108.56
NN-10	1.50	107.31
NN-15	1.55	110.12
NN-16	1.53	116.26
NN-22	1.55	115.63
NN-23	1.54	105.26

มีต่อ...

ตารางที่ 15 (ต่อ)

รหัสสายพันธุ์	ความกว้างบริเวณใส* / ความกว้างโคโลนี	กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)
NN-25	1.55	102.86
NN-28	1.54	100.54
NN-32	1.50	117.59
NN-35	1.53	110.12
NN-36	1.50	100.54
NN-38	1.50	100.54
NN-39	1.50	117.59
NN-40	1.53	115.63
NN-41	1.50	117.59
NN-43	1.53	102.86
NN-44	1.55	108.56

*ค่าเฉลี่ยจาก 5 ซ้ำ

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์ใหม่ที่คัดเลือกได้จากตารางที่ 15 ในสูตรอาหารและสภาวะเดิม เพื่อทดสอบการผลิตกรดมะนาวและกรดไอโซซิตริก ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 16 และ 17 พบว่าสายพันธุ์ NN-1 ผลิตกรดมะนาวได้สูงสุดและใกล้เคียงกันทั้ง 2 ครั้ง คือ 120.50 และ 121.20 กรัมต่อลิตร โดยคิดเป็นผลผลิต($\%Y_{p/s}$) (ภาคผนวก จ 2) เท่ากับ 61.99 และ 62.25 ส่วนการผลิตกรดไอโซซิตริกของแต่ละสายพันธุ์ยังไม่แตกต่างจากสายพันธุ์ N-57 อย่างชัดเจน โดยผลิตกรดไอโซซิตริกได้ประมาณ 13-15 กรัมต่อลิตร ดังนั้นในการคัดเลือกสายพันธุ์จึงพิจารณาผลผลิตกรดมะนาวเป็นหลัก

ตารางที่ 16 ปริมาณการผลิตกรดมะนาว, กรดไอโซซิตริก และน้ำตาลรีดิวซ์ จากการคัดเลือกขั้นทุติยภูมิ(ครั้งที่ 2) ของสายพันธุ์ *Candida oleophila* N-57 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ตั้งต้น และเชื้อสายพันธุ์ใหม่ เก็บผลชั่วโมงที่ 96(วิเคราะห์ผลด้วยวิธี HPLC)

รหัสสายพันธุ์	กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	กรดไอโซซิตริก (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลกลูโคสที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	ผลผลิต* $\%Y_{p/s}$
C-57	112.81	15.25	10.11	59.41
NN-1	120.50	13.67	5.60	61.99
NN-3	117.84	13.30	6.12	60.78
NN-16	118.30	15.32	6.12	61.02
NN-22	117.56	15.16	6.73	60.83
NN-32	118.31	14.33	5.30	60.77
NN-39	119.23	12.05	5.60	61.33
NN-40	118.26	14.50	5.83	60.91
NN-41	118.55	13.78	6.50	61.27

$$^{*}\text{ผลผลิต}(\%Y_{p/s}) = \frac{\text{กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร) X 100}}{\text{น้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น-น้ำตาลกลูโคสที่เหลือ}}$$

ตารางที่ 17 ปริมาณการผลิตกรดมะนาว, กรดไอโซซิตริก และน้ำตาลรีดิวซ์ จากการคัดเลือกขั้นทุติยภูมิ(ครั้งที่ 3) ของสายพันธุ์ *Candida oleophila* N-57 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ตั้งต้น และเชื้อสายพันธุ์ใหม่ เก็บผลชั่วโมงที่ 96(วิเคราะห์ผลด้วยวิธี HPLC)

รหัสสายพันธุ์	กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	กรดไอโซซิตริก (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลกลูโคสที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	ผลผลิต* $\%Y_{p/s}$
C-57	113.71	16.18	8.32	59.32
NN-1	121.20	15.06	5.30	62.25
NN-3	114.56	15.31	7.42	59.49
NN-16	115.71	14.62	7.42	60.08
NN-22	114.12	15.13	8.32	59.54
NN-32	117.41	15.25	6.12	60.56
NN-39	117.65	13.76	6.12	60.68
NN-40	113.86	14.49	7.42	59.12
NN-41	118.16	14.72	5.30	60.69

$$^{*}\text{ผลผลิต}(\%Y_{p/s}) = \frac{\text{กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร) X 100}}{\text{น้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น-น้ำตาลกลูโคสที่เหลือ}}$$

6. <u>การชักนำให้ *Candida oleophila* NN-1 เกิดการกลายพันธุ์ซ้ำด้วยแสงอุลตรา-ไวโอเลต</u>

จากผลการทดลองที่ 5 ได้คัดเลือกสายพันธุ์ NN-1 ซึ่งมีประสิทธิภาพการผลิตกรดมะนาวเป็น 121.42,120.50 และ 121.20 กรัมต่อลิตร จึงนำมาเป็นสายพันธุ์ตั้งต้นสำหรับการกลายพันธุ์ซ้ำด้วยแสงอุลตราไวโอเลตสลับกับสารเคมี NTG เนื่องจากผลการทดลองที่ 3 เมื่อใช้เวลาการฉายแสงอุลตราไวโอเลตเป็น 20, 30 และ 40 วินาที สามารถคัดเลือกได้สายพันธุ์ใหม่ที่มีประสิทธิภาพการผลิตกรดมะนาวสูงขึ้น (ตารางที่ 7) ดังนั้นจึงใช้เวลาการฉายแสงดังกล่าวสำหรับการชักนำสายพันธุ์ NN-1 ให้เกิดการกลายพันธุ์ตามวิธีในข้อ 5.2 คำนวณเปอร์เซนต์รอด ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 18 พบว่าอัตราการอยู่รอดของเซลล์สายพันธุ์ NN-1 ใกล้เคียงกับของสายพันธุ์ C-73 ซึ่งเป็นสายพันธุ์เดิม แต่เปอร์เซนต์ของสายพันธุ์ที่ให้ค่า potency index สูงขึ้น จะลดลงอย่างเห็นได้ชัด จากตารางที่ 18 มีสายพันธุ์ใหม่ 13 สายพันธุ์ ที่ให้บริเวณใสรอบๆโคโลนีกว้างกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น จึงนำสายพันธุ์ทั้ง 13 มาทดสอบการผลิตกรดมะนาวในอาหารเหลวต่อไป

ตารางที่ 18 เปอร์เซนต์รอด และจำนวนสายพันธุ์ใหม่ที่มีประสิทธิภาพการผลิตกรดสูงขึ้นจากการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ

เวลาที่ผ่านการฉายแสง UV (วินาที)	เปอร์เซนต์รอดของเซลล์	การคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ		
		จำนวนโคโลนีที่ทดสอบ	จำนวนสายพันธุ์ที่มีค่า potency index เพิ่มขึ้น	เปอร์เซนต์*
20	22.75	800	6	0.75
30	5.20	800	4	0.50
40	0.51	800	3	0.38

*เปอร์เซนต์สายพันธุ์ที่ให้ค่า potency index สูงขึ้น

จากการทดลองที่ผ่านมา จะใช้สูตรอาหาร PM1 ในการคัดเลือกขั้นทุติยภูมิ ซึ่งใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน แต่ในการทดลองนี้จะใช้แป้งที่ย่อยแล้วแทน(ภาคผนวก ง) เพราะเป็นวัตถุดิบที่มีราคาถูกกว่า เหมาะสำหรับใช้ในการผลิตระดับขยายส่วนต่อไป หลังจากเพาะเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์ใหม่ในอาหารเพื่อผลิตกรดมะนาว PM2 (ภาคผนวก ก 2) ที่มีแป้งที่ย่อยแล้วเป็นแหล่งคาร์บอน โดยคิดเป็นน้ำตาลกลูโคส 200 กรัมต่อลิตร และแคลเซี่ยมคาร์บอเนต 100 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 96 ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 19 พบว่า มีเชื้อสายพันธุ์ใหม่ 7 สายพันธุ์ ที่ให้ผลผลิตกรดมะนาวสูงกว่าสายพันธุ์ NN-1 เพียงเล็กน้อย ซึ่งอาจเกิดจากการจำกัดของสูตรอาหาร หรือสภาวะการเพาะเลี้ยงก็ได้ เนื่องจากค่า potency index แตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัด นอกจากนี้ความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อมีค่าประมาณ 3.5-4 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าปริมาณแคลเซี่ยมคาร์บอเนตไม่เพียงพอ ดังนั้นจึงเพิ่มปริมาณแคลเซี่ยมคาร์บอเนตเป็น 110 กรัมต่อลิตร ส่วนปริมาณสารอื่นๆ เหมือนสูตรอาหาร PM2 ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 20 จะเห็นว่าการผลิตกรดมะนาวมีความแตกต่างกันเพิ่มมากขึ้น สำหรับน้ำตาลกลูโคสที่เหลือ พบว่าเชื้อสายพันธุ์ใหม่สามารถใช้น้ำตาลกลูโคสได้หมดในสภาวะที่กำหนด นั่นแสดงว่าน้ำตาลกลูโคสเป็นปัจจัยที่จำกัดการผลิต ดังนั้นจึงเพิ่มแป้งที่ผ่านการย่อยแล้ว โดยคิดเป็นน้ำตาลกลูโคส 220 กรัมต่อลิตร และเพิ่มปริมาณแคลเซี่ยมคาร์บอเนตเป็น 120 กรัมต่อลิตร ผลแสดงในตารางที่ 21 พบว่าเชื้อสายพันธุ์ใหม่บางสายพันธุ์มีประสิทธิภาพการผลิตกรดมะนาวลดลง แต่สายพันธุ์ NNU-50 และ NNU-62 ยังคงให้ผลผลิตที่สูงขึ้นเป็น 138.04 และ 138.50 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งคิดเป็นผลผลิต($\%Y_{p/s}$) (ภาคผนวก จ 2)เท่ากับ 63.36 และ 63.18 จะเห็นว่าทั้งสองสายพันธุ์มีประสิทธิภาพการผลิตกรดมะนาวใกล้เคียงกัน แต่สายพันธุ์ NNU-62 จะมีค่าความเป็นกรดด่างสุดท้ายต่ำกว่า และน้ำตาลกลูโคสที่เหลือน้อยกว่า นอกจากนั้นอัตราส่วนของกรดมะนาวต่อกรดไอโซซิตริกของสายพันธุ์ NNU-50 และ NNU-62 เท่ากับ 8.70 และ 9.14 ตามลำดับ ดังนั้นจึงเลือกสายพันธุ์ NNU-62 เพื่อนำไปทดสอบต่อไป

ตารางที่ 19 ค่า potency index และปริมาณกรดมะนาวของ *Candida oleophila* สายพันธุ์ NN-1 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ตั้งต้น และเชื้อสายพันธุ์ใหม่ที่คัดเลือกได้เก็บผลชั่วโมงที่ 96 (วิเคราะห์ด้วยวิธีเพนตระโบรโมอะซิโตน) เมื่อใช้แป้งที่ย่อยแล้ว คิดเป็นน้ำตาลกลูโคส 200 และแคลเซียมคาร์บอเนต 100 กรัมต่อลิตร

รหัสสายพันธุ์	ความกว้างบริเวณใส* / ความกว้างโคโลนี	กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)
NN-1	1.54	121.23
NNU-9	1.61	120.46
NNU-20	1.64	123.12
NNU-45	1.61	121.98
NNU-48	1.66	125.37
NNU-50	1.64	127.40
NNU-51	1.68	79.34
NNU-52	1.64	123.12
NNU-54	1.59	126.36
NNU-55	1.61	126.36
NNU-58	1.64	126.36
NNU-62	1.67	127.85
NNU-63	1.67	123.12
NNU-67	1.58	125.37

*ค่าเฉลี่ยจาก 5 ซ้ำ

ตารางที่ 20 ปริมาณกรดมะนาวและกรดไอโซซิตริก ผลิตโดย *Candida oleophila* สายพันธุ์ NN-1 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ดั้งต้นและเชื้อสายพันธุ์ใหม่ เก็บผลชั่วโมงที่ 96 (วิเคราะห์ผลด้วยวิธี HPLC) เมื่อใช้แป้งที่ย่อยแล้ว คิดเป็นน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น 200 และแคลเซี่ยมคาร์บอเนต 110 กรัมต่อลิตร และ pH เริ่มต้น 6.78

รหัสสายพันธุ์	pH สุดท้าย	กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	กรดไอโซซิตริก (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลกลูโคสที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	ผลผลิต* ($\%Y_{p/s}$)
NN-1	5.63	119.94	13.83	13.56	4.89	61.47
NNU-48	5.27	128.37	13.65	8.53	0	64.19
NNU-50	4.85	129.11	15.35	8.38	0	64.56
NNU-54	5.53	127.66	14.14	8.38	0	63.83
NNU-55	5.74	128.51	13.73	8.38	0	64.26
NNU-58	5.04	127.91	12.08	7.21	0	63.96
NNU-62	4.61	128.72	14.43	8.12	0	64.36
NNU-67	5.68	128.62	15.68	8.38	0	64.31

$$*\text{ผลผลิต}(\%Y_{p/s}) = \frac{\text{กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร) X 100}}{\text{น้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น-น้ำตาลกลูโคสที่เหลือ}}$$

ตารางที่ 21 ปริมาณกรดมะนาวและกรดไอโซซิตริก ผลิตโดย *Candida oleophila* สายพันธุ์ NN-1 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ตั้งต้นและเชื้อสายพันธุ์ใหม่ เก็บผลชั่วโมงที่ 96 (วิเคราะห์ผลด้วยวิธี HPLC) เมื่อใช้แป้งที่ย่อยแล้ว คิดเป็นน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น 220 และแคลเซี่ยมคาร์บอเนต 120 กรัมต่อลิตร และ pH เริ่มต้น 6.78

รหัสสายพันธุ์	pH สุดท้าย	กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	กรดไอโซซิตริก (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลกลูโคสที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	ผลผลิต* ($\%Y_{p/s}$)
NN-1	5.73	129.32	14.89	16.80	3.24	59.66
NNU-48	5.47	133.89	15.54	15.24	1.65	61.32
NNU-50	5.18	138.04	15.87	15.72	2.12	63.36
NNU-54	5.70	127.48	16.45	16.12	2.97	58.74
NNU-55	5.74	124.44	16.06	28.45	13.54	60.27
NNU-58	6.10	131.83	14.35	22.39	8.28	62.27
NNU-62	4.56	138.50	15.15	12.53	0.80	63.18
NNU-67	5.78	124.38	17.57	24.39	8.49	58.81

$$*\text{ผลผลิต}(\%Y_{p/s}) = \frac{\text{กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)} \times 100}{\text{น้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น-น้ำตาลกลูโคสที่เหลือ}}$$

7. <u>ความเสถียรในการผลิตกรดมะนาวของ *Candida oleophila* สายพันธุ์ตั้งต้นและสายพันธุ์ใหม่ที่คัดเลือกได้</u>

ความเสถียรในการผลิตสารผลิตภัณฑ์ของเชื้อเป็นสิ่งที่สำคัญมาก สำหรับอุตสาหกรรมที่ใช้เชื้อจุลินทรีย์ ดังนั้นในการปรับปรุงสายพันธุ์จะต้องพิจารณาความเสถียรด้วย การทดลองนี้จะทดสอบความเสถียรในการผลิตกรดมะนาว โดยถ่ายเชื้อลงบนอาหารวุ้นลาดเอียงทุกๆ 3 วัน เพาะเลี้ยงครั้งที่ 1,2,3,4 และ 5 เมื่อถ่ายเชื้อได้ 15,30,45, 60 และ 75 วัน ตามลำดับ เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร PM3 (ภาคผนวก ก 2) เก็บผลชั่วโมงที่ 96 วิเคราะห์ปริมาณกรดมะนาวด้วยวิธี HPLC ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 22 คำนวณค่าเฉลี่ย และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard Deviation) (ภาคผนวก จ 4) เขียนกราฟเปรียบเทียบการผลิตกรดมะนาวในแต่ละครั้งได้ดังรูปที่ 18 จะเห็นได้ว่าปริมาณกรดมะนาวครั้งที่ 1-5 ของแต่ละสายพันธุ์จะแตกต่างกันเล็กน้อย สายพันธุ์ U-40 เป็นสายพันธุ์ที่มีค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานมากที่สุด เท่ากับ 3.36 แสดงให้เห็นว่าการผลิตกรดมะนาวยังไม่คงที่ ส่วนสายพันธุ์อื่นๆมีค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานไม่มากนัก โดยสายพันธุ์ N-57, NN-1 และ NNU-62 ปริมาณกรดมะนาวกรดมะนาวเท่ากับ 120±0.86, 128.44±1.64 และ 136.66±1.27 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งมีความคงที่ในการผลิตกรดมะนาวในระดับที่น่าพอใจ

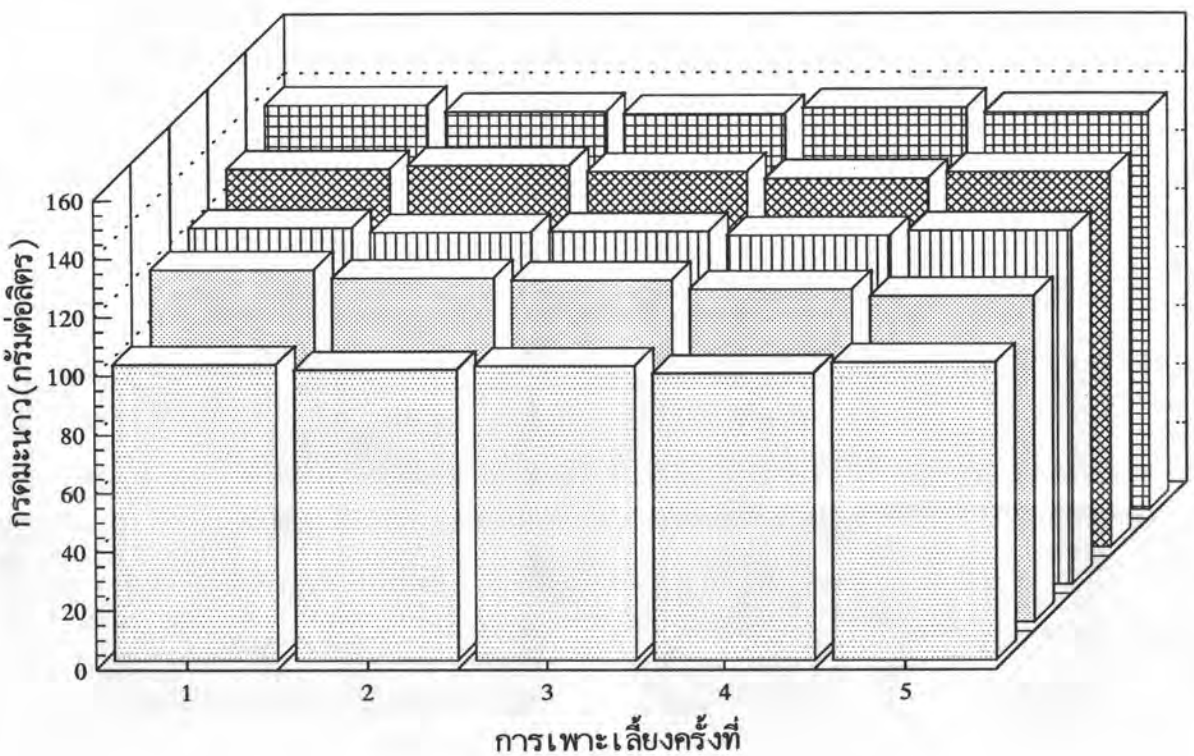
ตารางที่ 22 ผลผลิตกรดมะนาวของ *Candida oleophila* สายพันธุ์ตั้งต้นและสายพันธุ์ใหม่ที่คัดเลือกได้ในแต่ละครั้งของการกลายพันธุ์

ครั้งที่	ปริมาณกรดมะนาวที่ผลิต (กรัมต่อลิตร)				
	C-73	U-40	N-57	NN-1	NNU-62
1	100.70	120.26	121.86	129.32	138.50
2	98.84	117.44	120.23	130.42	136.16
3	100.12	116.15	120.10	128.36	135.38
4	97.53	113.38	119.56	126.00	137.41

มีต่อ...

ตารางที่ 22 (ต่อ)

ครั้งที่	ปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้ (กรัมต่อลิตร)				
	C-73	U-40	N-57	NN-1	NNU-62
5	101.34	111.74	120.36	128.10	135.87
ค่าเฉลี่ย	99.71	115.81	120.54	128.44	136.66
ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	1.53	3.36	0.86	1.64	1.27



รูปที่ 18 ผลผลิตกรดมะนาวของสายพันธุ์ตั้งต้นและสายพันธุ์ใหม่ 4 สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ จากการเพาะเลี้ยง 5 ครั้ง เก็บผลชั่วโมงที่ 96 ของการเพาะเลี้ยง และวิเคราะห์ผลด้วย HPLC

8. <u>ลักษณะของเซลล์ ปริมาณกรดมะนาว และกรดไอโซซิตริก ที่ผลิตโดย *Candida oleophila* สายพันธุ์ C-73 กับสายพันธุ์ NNU-62 ซึ่งเป็นสายพันธุ์กลายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพเพิ่มมากที่สุด โดยเพาะเลี้ยงในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวระดับขวดเขย่า</u>

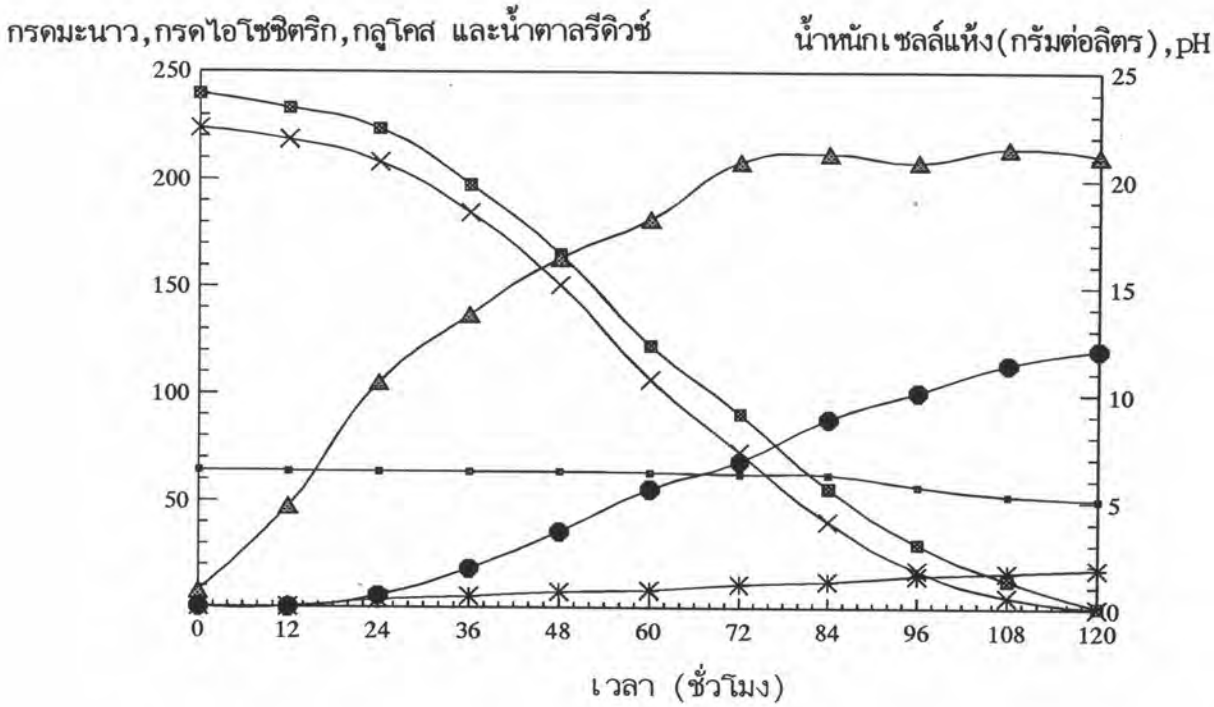
จากการทดลองที่ผ่านมา พบว่า สายพันธุ์ใหม่ที่คัดเลือกไว้ จะให้ผลผลิตกรดมะนาวสูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 96 ชั่วโมงในสูตรอาหารและสภาวะที่กำหนด โดยเชื้อสายพันธุ์ NNU-62 สามารถผลิตกรดมะนาวได้สูงที่สุด คือ 136.66 กรัมต่อลิตร (ค่าเฉลี่ยจากตารางที่ 22) ซึ่งผลผลิตกรดมะนาวเพิ่มขึ้นจากสายพันธุ์ตั้งต้นคิดเป็นร้อยละ 37.06 ดังนั้นในการทดลองนี้จึงเลือกเชื้อสายพันธุ์ NNU-62 สำหรับเปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิตกรดมะนาวในระดับขวดเขย่า กับสายพันธุ์ตั้งต้น ส่วนสายพันธุ์ NNU-65 เป็นสายพันธุ์ที่มีการผลิตกรดมะนาวต่ำกว่าสายพันธุ์ C-73 มาก จึงนำมาทำการเปรียบเทียบด้วย ทดสอบการผลิตกรดมะนาว, กรดไอโซซิตริก, การใช้น้ำตาล, การเปลี่ยนแปลงของความเป็นกรดด่าง น้ำหนักเซลล์ และลักษณะของเซลล์ โดยเพาะเลี้ยงตามวิธีการทดลองข้อ 3.3 ในสูตรอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวที่มีแป้งที่ย่อยแล้ว คิดเป็นกลูโคส 220 กรัมต่อลิตร และแคลเซียมคาร์บอเนต 120 กรัมต่อลิตร เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง ก่อนละลายตะกอนแคลเซียมซิเตรท นำเซลล์มาดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อเปรียบเทียบลักษณะเซลล์ของ สายพันธุ์ C-73 กับ NNU-62 และ ที่เวลาต่างๆ ของการเพาะเลี้ยง จากนั้นจึงทำการวิเคราะห์ปริมาณกรดมะนาวได้ผลดังแสดงในตารางที่ 23 และ 24 และกราฟรูปที่ 19 ถึง 21 พบว่า การผลิตกรดมะนาวของทั้ง 2 สายพันธุ์แตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัด ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 36 ของการเพาะเลี้ยง(รูปที่ 21) จากรูปที่ 19 และ 20 น้ำหนักเซลล์แห้งของสายพันธุ์ C-73 และ NNU-62 ใกล้เคียงกัน โดยจะคงที่ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 72 ของการเพาะเลี้ยง ส่วนการใช้น้ำตาลจะสอดคล้องกับการเพิ่มขึ้นของกรดมะนาว สำหรับการผลิตกรดไอโซซิตริก พบว่า สายพันธุ์ NNU-62 ผลิตต่ำกว่าสายพันธุ์ C-73 เล็กน้อย นอกจากนั้นการเปลี่ยนแปลงของความเป็นกรดด่างของสายพันธุ์ C-73 และ NNU-62 จะลดลงอย่างเห็นได้ชัดหลังจากชั่วโมงที่ 84 ของการเพาะเลี้ยง โดยสายพันธุ์ NNU-62 จะมีค่าความเป็นกรดด่างต่ำกว่าสายพันธุ์ C-73

ตารางที่ 23 ผลการเพาะเลี้ยง *Candida oleophila* สายพันธุ์ C-73 ในอาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะที่กำหนด ระดับขวดเขย่า

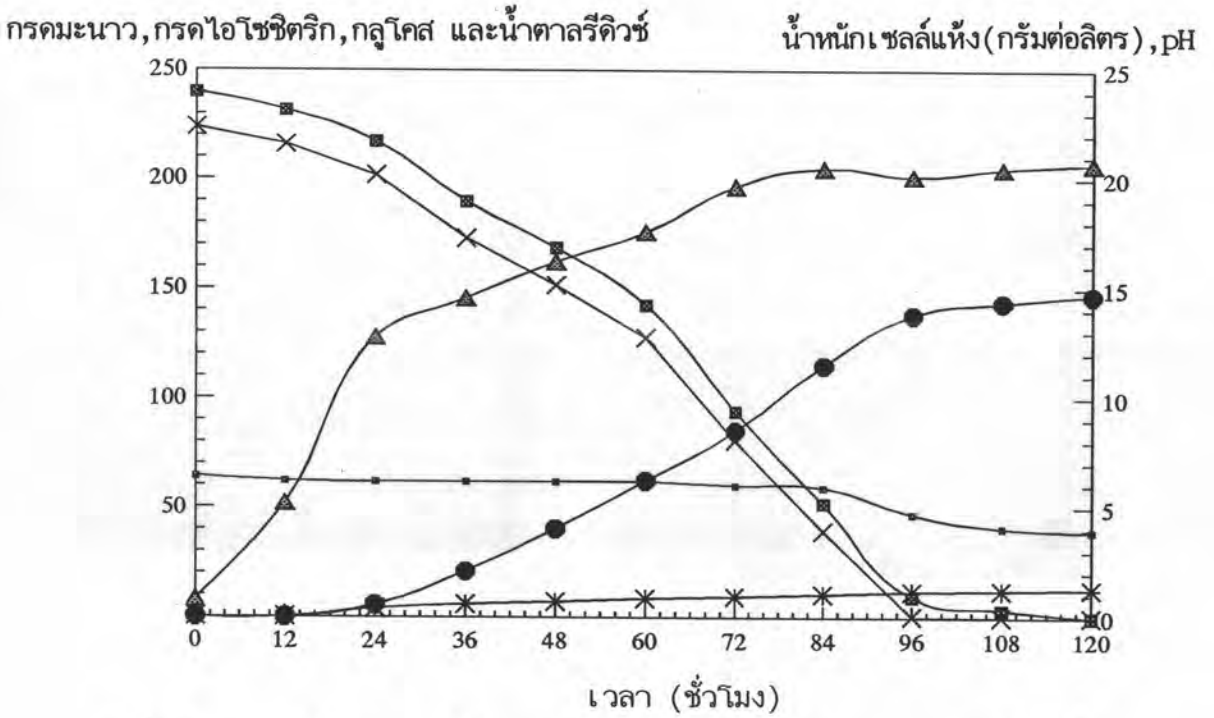
เวลา (ชั่วโมง)	pH	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	กรดไอโซซิตริก (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลกลูโคสที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)
0	6.42	0.75	0	0	239.76	223.60
12	6.38	4.73	0	0	233.28	218.40
24	6.38	10.51	5.49	3.54	223.56	208.00
36	6.36	13.68	18.30	5.08	197.64	184.60
48	6.37	16.35	35.68	7.16	165.24	150.80
60	6.32	18.16	55.51	8.02	122.47	106.62
72	6.25	20.83	68.34	10.93	90.72	72.80
84	6.23	21.21	88.14	12.25	56.05	40.56
96	5.69	20.82	100.84	15.02	30.13	17.68
108	5.26	21.46	113.89	16.56	12.96	5.20
120	5.09	21.13	120.72	18.44	0.66	0

ตารางที่ 24 ผลการเพาะเลี้ยง *Candida oleophila* สายพันธุ์ NNU-62 ในอาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะที่กำหนด ระดับขวดเขย่า

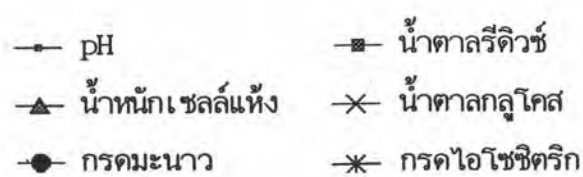
เวลา (ชั่วโมง)	pH	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	กรดไอโซซิตริก (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลกลูโคสที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)
0	6.40	0.79	0	0	239.76	223.60
12	6.20	5.16	0	0	231.66	215.80
24	6.16	12.75	5.35	3.77	217.08	201.50
36	6.17	14.53	20.74	5.66	189.54	172.90
48	6.16	16.20	40.14	6.81	168.48	151.40
60	6.17	17.57	62.04	8.34	142.24	127.40
72	5.99	19.65	84.93	9.17	93.96	80.60
84	5.89	20.48	114.84	10.3	51.84	39.26
96	4.68	20.10	137.74	11.5	9.30	0.26
108	4.06	20.46	143.35	12.1	3.32	0
120	3.93	20.68	146.76	12.6	0	0

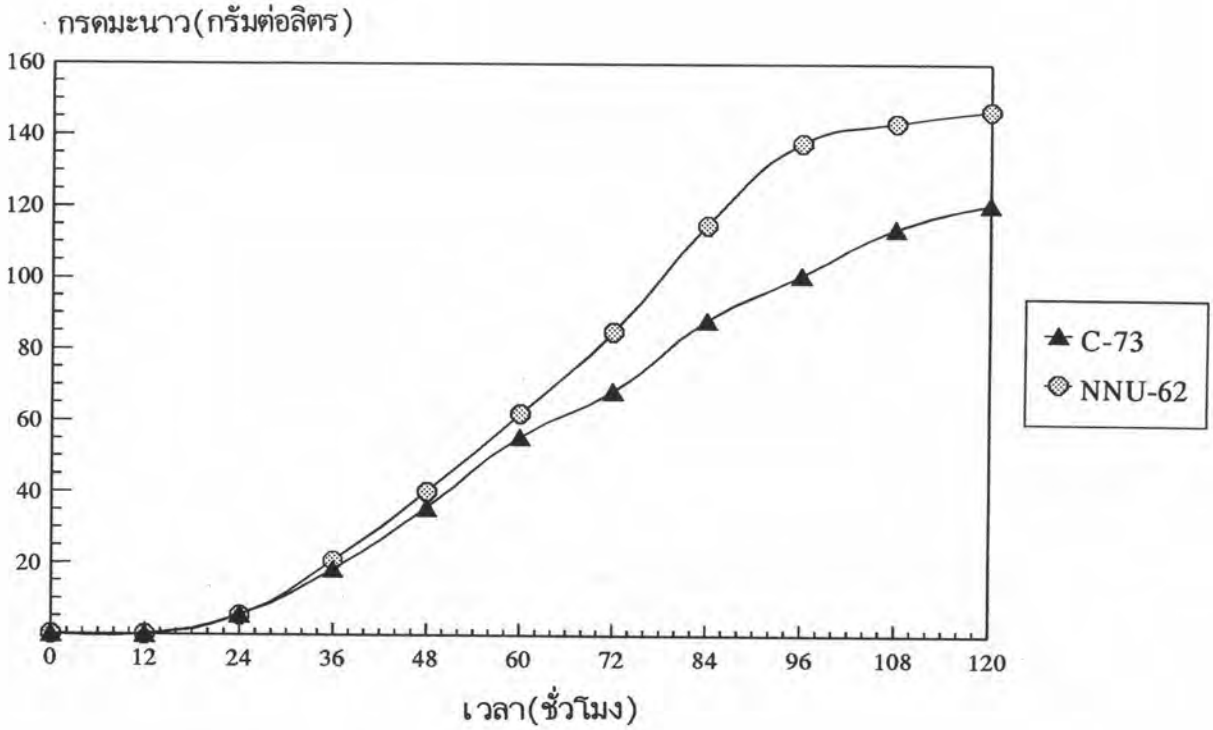


รูปที่ 19 การเจริญและการผลิตกรดมะนาวของ *Candida oleophila* สายพันธุ์ C-73 ในระดับขวดเขย่า



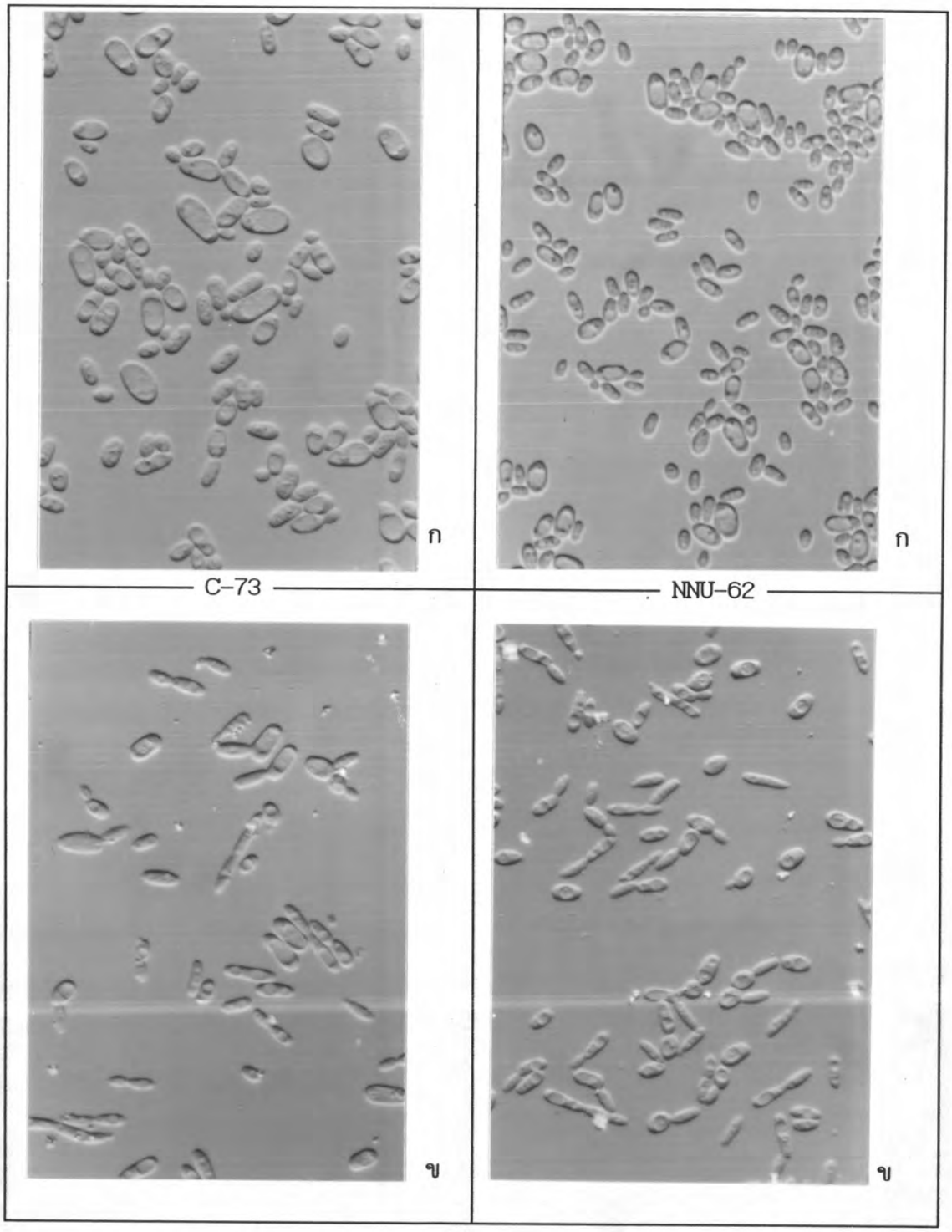
รูปที่ 20 การเจริญและการผลิตกรดมะนาวของ *Candida oleophila* สายพันธุ์ NNU-62 ในระดับขวดเขย่า





รูปที่ 21 กรดมะนาวที่ผลิตได้จากสายพันธุ์ C-73 และ NNU-62 ในขวดเขย่า

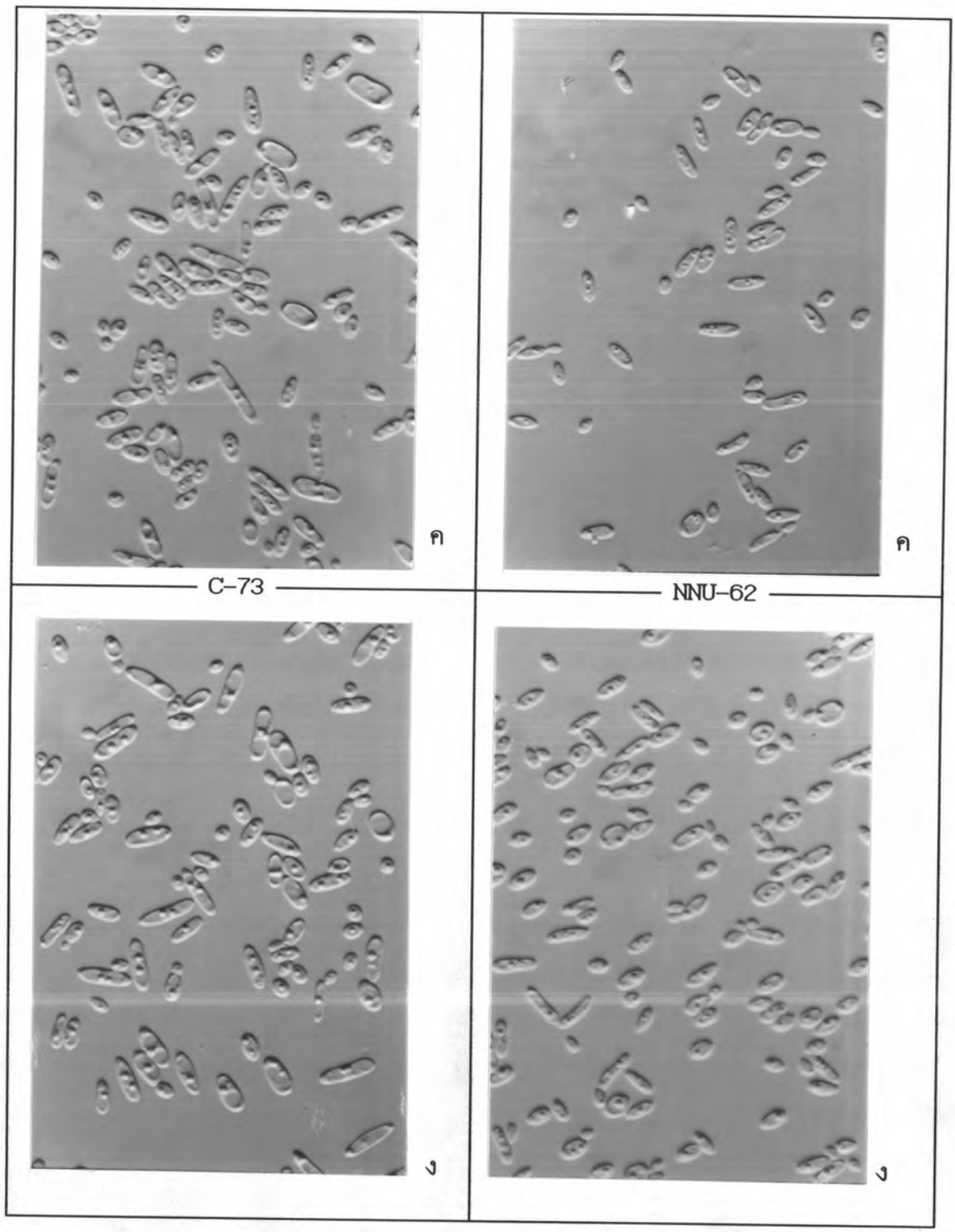
จากการดูลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ได้ภาพถ่ายดังแสดงในรูปที่ 22 โดยใช้กำลังขยาย 400 เท่า ถ่ายด้วยระบบ Nomarski DIC (differential interference contrast) จะเห็นว่า รูปร่างเซลล์ของสายพันธุ์ C-73 และ NNU-62 ในอาหาร YM ที่ 15 ชั่วโมง ซึ่งเป็นหัวเชื้อที่ใช้ในการทดลอง มีรูปร่างค่อนข้างรี (oval shape) มีทั้งขนาดเล็กและใหญ่ หลังจากนั้นเพาะเลี้ยงในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวที่ 12 ชั่วโมง เซลล์จะมีรูปร่างยืดยาว (elongated shape) และยังมีการแตกหน่อด้วย เมื่อเพาะเลี้ยงได้ 24 ชั่วโมง เซลล์จะมีทั้งรูปร่างยืดยาวและรูปร่างรีผสมกัน เซลล์ส่วนใหญ่จะเป็นเซลล์เดี่ยวมีทั้งขนาดเล็กและใหญ่ ส่วนรูปร่างของเซลล์ที่ 36,48 และ 72 จะไม่แตกต่างจากชั่วโมงที่ 24 ของการเพาะเลี้ยง



รูปที่ 22 ลักษณะเซลล์ของสายพันธุ์ C-73 และ NNU-62 ที่เวลาต่างๆ ของการเพาะเลี้ยง กำลังขยาย 400 เท่า

ก) หัวเชื้ออายุ 15 ชั่วโมง ในอาหาร YM

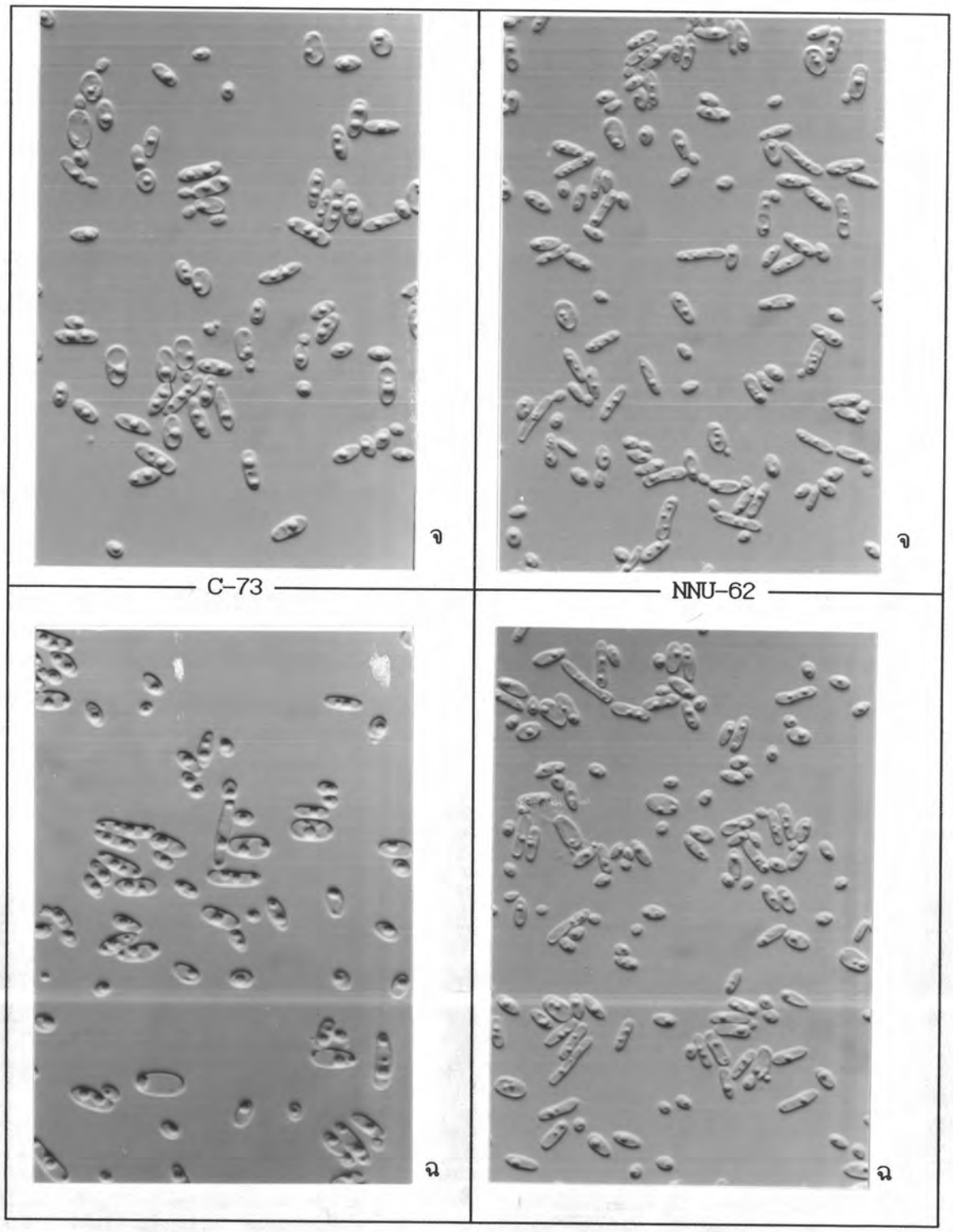
ข) ชั่วโมงที่ 12 ของการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร PM3



รูปที่ 22 (ต่อ) ลักษณะเซลล์ของสายพันธุ์ C-73 และ NNU-62 ที่เวลาต่างๆ ของการเพาะเลี้ยง กำลังขยาย 400 เท่า

ค) ชั่วโมงที่ 24 ของการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร PM3

ง) ชั่วโมงที่ 36 ของการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร PM3



รูปที่ 22 (ต่อ) ลักษณะเซลล์ของสายพันธุ์ C-73 และ NNU-62 ที่เวลาต่างๆ ของการเพาะเลี้ยง กำลังขยาย 400 เท่า

จ) ชั่วโมงที่ 48 ของการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร PM3

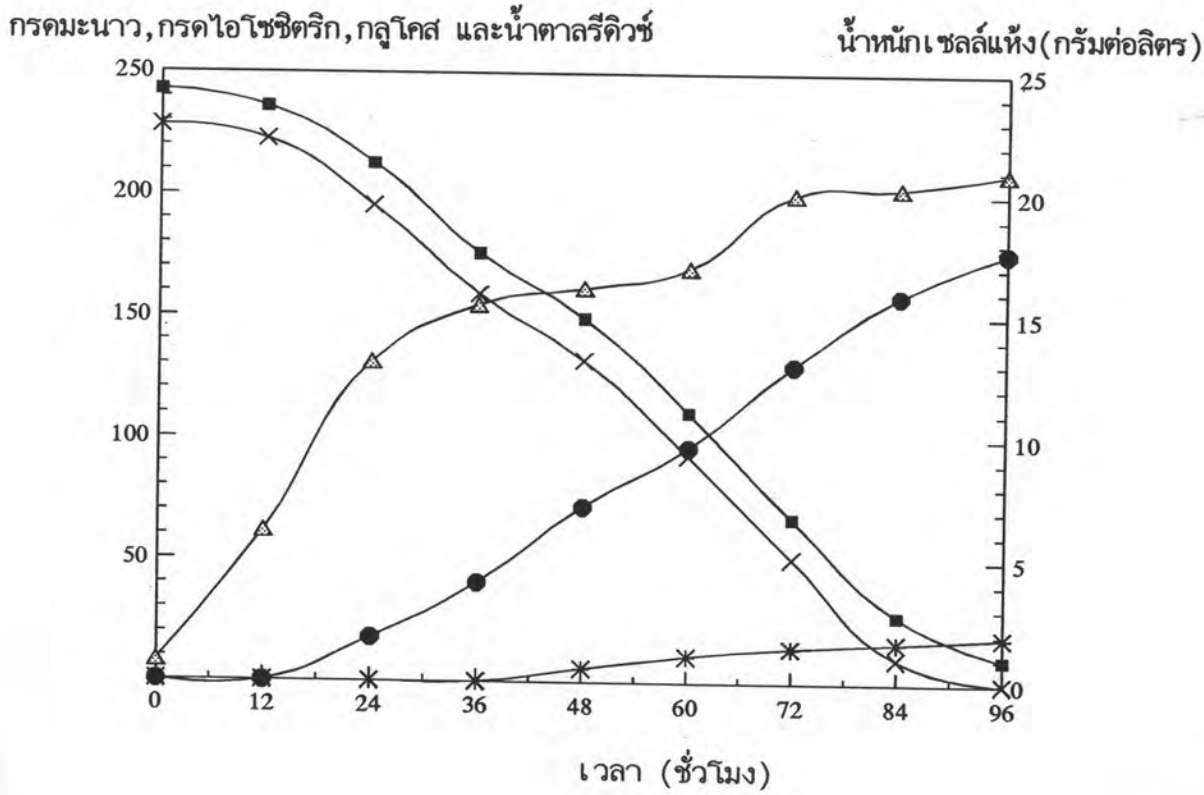
ฉ) ชั่วโมงที่ 72 ของการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร PM3

9. <u>ประสิทธิภาพการผลิตกรดมะนาวของ *Candida oleophila* สายพันธุ์ NNU-62 ในถังหมัก 5 ลิตร</u>

จากการทดลองที่ผ่านมา *Candida oleophila* สายพันธุ์ NNU-62 เป็นสายพันธุ์ที่ผลิตกรดมะนาวได้มากที่สุด เท่ากับ 136.66 กรัมต่อลิตร ที่ 96 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง ในสูตรอาหาร PM3 และสภาวะที่กำหนด จึงทำการเพาะเลี้ยงสายพันธุ์นี้ ในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยมีแป้งที่ย่อยแล้วคิดเป็นกลูโคส 220 กรัมต่อลิตร และแคลเซี่ยม-คาร์บอเนต 120 กรัมต่อลิตร อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 ลิตรต่อลิตรของอาหารต่อนาที ได้ผลดังตารางที่ 24 และกราฟรูปที่ 8 จะเห็นว่าในช่วง 24 ชั่วโมงแรกของการเพาะเลี้ยง การเพิ่มขึ้นของน้ำหนักเซลล์แห้งเป็นไปอย่างรวดเร็ว และหลังจากที่น้ำหนักเซลล์เริ่มคงที่ การผลิตกรดมะนาวก็จะเพิ่มขึ้นอย่างสม่ำเสมอ จนกระทั่งปริมาณน้ำตาลกลูโคสหมด สายพันธุ์ NNU-62 สามารถผลิตกรดมะนาวได้สูงกว่าและเร็วกว่าในระดับขวดเขย่า โดยผลิตเพิ่มขึ้นจากระดับขวดเขย่าร้อยละ 18.13 และการผลิตกรดไอโซซิตริกสูงกว่าในระดับขวดเขย่า ซึ่งอาจเกิดจากสูตรอาหารและสภาวะที่เพาะเลี้ยงยังไม่เหมาะสม สำหรับการใช้น้ำตาลกลูโคสจะเพิ่มขึ้นอย่างสม่ำเสมอ จนกระทั่งน้ำตาลกลูโคสหมด ซึ่งสอดคล้องกับการผลิตกรดมะนาว ความแตกต่างระหว่างน้ำตาลรีดิวซ์กับกลูโคส แสดงให้เห็นว่าเชื้อสายพันธุ์นี้สามารถใช้น้ำตาลกลูโคสได้อย่างเดียว จากตารางที่ 24 ผลผลิตกรดมะนาวได้สูงถึง 173.36 กรัมต่อลิตร คิดเป็นผลผลิตร้อยละ 76.03 เทียบกับปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ใช้ นอกจากนี้การที่สายพันธุ์ NNU-62 สามารถเพาะเลี้ยงในน้ำตาลที่มีความเข้มข้นถึง 220 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จึงเป็นข้อได้เปรียบที่ดีกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น อย่างไรก็ตามการผลิตกรดมะนาวยังมีกรดอื่นๆ ปนเปื้อนอยู่ด้วย เช่น กรดไอโซซิตริก, กรดคีโตกลูตาริก และกรดฟูมาริก เป็นต้น ซึ่งชนิดและปริมาณของกรดที่ปนเปื้อนจะขึ้นอยู่กับสูตรอาหารและสภาวะที่เพาะเลี้ยง ดังนั้นจึงควรทำการทดลองปรับปรุงต่อไป

ตารางที่ 24 ผลการเพาะเลี้ยง *Candida oleophila* สายพันธุ์ NNU-62 ในอาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะที่กำหนด ระดับถังหมัก 5 ลิตร

เวลา (ชม.)	pH	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	กรดไอโซซิตริก (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลกลูโคสที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)
0	6.34	0.80	0	0	228.03	242.61
12	6.36	6.14	0	0	221.58	235.94
24	6.37	13.08	17.82	0	195.32	212.57
36	6.38	15.44	40.39	0	158.98	175.85
48	6.37	16.16	71.83	5.48	131.73	149.15
60	6.17	17.00	96.36	10.76	93.12	110.76
72	5.90	20.03	129.77	14.34	50.88	67.37
84	5.31	20.29	158.54	16.58	9.99	27.65
96	4.39	20.92	173.36	19.03	0	9.96



รูปที่ 23 การเจริญ และการผลิตกรดมะนาวของ *Candida oleophila* สายพันธุ์ NNU-62 ในถังหมัก 5 ลิตร

- น้ำหนักเซลล์แห้ง
- กรดมะนาว
- กรดไอโซซิตริก
- น้ำตาลรีดิวซ์
- น้ำตาลกลูโคส