การปรับปรุงสายพันธุ์ *Candida oleophila* C-73 เพื่อผลิตกรดมะนาว

นายสมศักดิ์ นาคซื่อตรง

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
หลักสูตรเทคโนโลยีทางชีวภาพ
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ. 2537

ISBN 974-584-552-3

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

28 เม.ย. 2547
I 18747905

STRAIN IMPROVEMENT OF *Candida oleophila* C-73 FOR CITRIC ACID PRODUCTION

Mr. Somsak Naksuetrong

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science

Programme of Biotechnology

Graduate School

Chulalongkorn University

1994

ISBN 974-584-552-3

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การปรับปรุงสายพันธุ์ *Candida oleophila* C-73 เพื่อผลิตกรดมะนาว
โดย	นายสมศักดิ์ นาคซื่อตรง
ภาควิชา	หลักสูตรเทคโนโลยีทางชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ วินิจ ขำวิวรรธน์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร.นลิน นิลอุบล
	รองศาสตราจารย์ ดร.ส่งศรี กุลปรีชา

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

_____ คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(ศาสตราจารย์ ดร. ถาวร วัชราภัย)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

_____ ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุรพงศ์ นวังคสัตถุศาสน์)

_____ อาจารย์ที่ปรึกษา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ วินิจ ขำวิวรรธน์)

_____ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(รองศาสตราจารย์ ดร. นลิน นิลอุบล)

_____ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(รองศาสตราจารย์ ดร. ส่งศรี กุลปรีชา)

_____ กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ)

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

สมศักดิ์ นาคซื่อตรง : การปรับปรุงสายพันธุ์ *Candida oleophila* C-73 เพื่อผลิตกรดมะนาว (STRAIN IMPROVEMENT OF *Candida oleophila* C-73 FOR CITRIC ACID PRODUCTION) อาจารย์ที่ปรึกษา: ผศ.วินิจ ขำวิวรรธน์,อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม: รศ.ดร. นลิน นิลอุบล และ รศ.ดร.ส่งศรี กุลปรีชา, 107 หน้า. ISBN 974-584-552-3

งานวิจัยนี้เป็นการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตกรดมะนาวของ *Candida oleophila* สายพันธุ์ C-73 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ผลิตกรดมะนาวได้ 99.71 กรัมต่อลิตร ในสูตรอาหาร PM3 การกลายพันธุ์ทำโดยใช้ NTG อย่างต่อเนื่อง 2 ขั้นตอน แล้วตามด้วยการฉายแสงอุลตราไวโอเลต ในขั้นตอนสุดท้าย การคัดเลือกสายพันธุ์กลายพันธุ์ขั้นปฐมภูมิใช้ค่า โพเทนซี อินเดกซ์ (potency index) ซึ่งเป็นวิธีที่พัฒนาขึ้น เป็นเกณฑ์ในการคัดเลือก ส่วนการคัดเลือกขั้นทุติยภูมิ ทำโดยวิเคราะห์ปริมาณกรดมะนาวในน้ำหมัก โดยวิธีเพนตะโบรโมอะซิโตน และวิธี HPLC พบว่าค่าโพเทนซี อินเดกซ์ มีความสัมพันธ์กับปริมาณกรดมะนาว ผลการกลายพันธุ์ สามารถคัดเลือกสายพันธุ์ที่ผลิตกรดมะนาวได้สูงสุดในแต่ละขั้นตอน คือ สายพันธุ์ N-57, NN-1 และ NNU-62 ซึ่งผลิตกรดมะนาวได้ 120.54, 128.44 และ 136.66 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ที่ 96 ชั่วโมงของการหมัก โดยพบว่าสูงกว่าที่ผลิตโดยสายพันธุ์ C-73 ร้อยละ 20.89,28.81 และ 37.06 ตามลำดับ จากการทดสอบประสิทธิภาพการผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 5 ลิตร ของสายพันธุ์ NNU-62 พบว่าสามารถผลิตกรดมะนาวได้สูงถึง 173.36 กรัมต่อลิตร ที่ 96 ชั่วโมงของการหมัก ความสามารถของสายพันธุ์ NNU-62 อยู่ในระดับคงที่หลังจากทดสอบการผลิตอย่างต่อเนื่อง 5 ครั้ง ในระยะเวลา 75 วัน

ภาควิชา หลักสูตรเทคโนโลยีทางชีวภาพ ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา หลักสูตรเทคโนโลยีทางชีวภาพ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2536 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

##C426534 : MAJOR BIOTECHNOLOGY
KEY WORD: *Candida oleophila*/ CITRIC ACID/ STRAIN IMPROVEMENT

SOMSAK NAKSUETRONG : STRAIN IMPROVEMENT OF *Candida oleophila* C-73 FOR CITRIC ACID PRODUCTION. THESIS ADVISOR : ASST. PROF. VINICH KHAMVIWATH. THESIS CO-ADVISORS : ASSO. PROF. NALINE NILUBON, Ph.D. AND ASSO.PROF. SONGSRI KULPREECHA, Ph.D. 107 pp.ISBN 974-584-552-3

Strain improvement of *Candida oleophila* C-73,a strain capable to produce 99.71 gram of citric acid per litre in PM3 medium, was performed by mutating with NTG for two consecutive steps and then with UV for the last step.Potency index,a technique developed in this study, was used for primary screening for the mutants.Secondary screening was done by determination of citric acid concentration in fermentation broth by pentabromoacetone and HPLC methods. With these techniques, the correlation between potency index and citric acid production was observed. Strain N-57, NN-1 and NNU-62 were mutants selected from each step of the treatment showing highest ability to produce citric acid of 120.54, 128.44 and 136.66 gram per litre,respectively after 96 hours of cultivation which were 20.89%, 28.81% and 37.06% higher than that produced by strain C-73. Cultivation of NNU-62 in 5-L fermentor gave maximum citric acid yield of 173.36 gram per litre after 96 hours of cultivation. Stability of citric acid producing ability of NNU-62 was still observed after 5 consecutive fermentations within 75 days.

ภาควิชา หลักสูตรเทคโนโลยีทางชีวภาพ ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา หลักสูตรเทคโนโลยีทางชีวภาพ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2536 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ วินิจ ขำวิวรรธน์ รองศาสตราจารย์ ดร.นลิน นิลอุบล และรองศาสตราจารย์ ดร.ส่งศรี กุลปรีชา ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษา คำแนะนำ และข้อคิดเห็นต่างๆ ในการทำวิจัย รวมทั้งช่วยตรวจสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุรพงศ์ นวังคสัตถุศาสน์ ที่กรุณาเป็นประธานกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ และรองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ ที่ได้กรุณาเป็นกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.นลิน นิลอุบล ผู้อำนวยการสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้กรุณาเอื้อเฟื้อสถานที่ อุปกรณ์เครื่องมือ และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มานะ ศรียุทธศักดิ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อมร เพชรสม และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ ตลอดจนคณาจารย์คณะวิทยาศาสตร์ทุกท่าน ที่ได้ให้คำปรึกษา และคำแนะนำต่างๆ ที่เป็นประโยชน์ต่อการทำงานวิจัย

ขอขอบพระคุณ นักวิจัย ช่างเทคนิค และเจ้าหน้าที่ของสถาบันฯทุกท่าน ที่ได้ให้ความช่วยเหลือ คำแนะนำ และอำนวยความสะดวกในระหว่างการทำงานวิจัยนี้

ขอขอบคุณ คุณสนธวรรณ สุภัทรประทีป คุณประเสริฐ หาญเมืองใจ พี่ๆ น้องๆ และเพื่อนทุกคน ที่ได้ให้กำลังใจ ความช่วยเหลือ และคำแนะนำ จนงานวิจัยนี้สำเร็จลงได้ด้วยดี

ขอขอบคุณ บริษัท East Asiatic(ประเทศไทย) จำกัด ที่ได้เอื้อเฟื้อตัวอย่างเอนไซม์ ที่ใช้ในการย่อยแป้งมันสำปะหลัง และขอขอบคุณ บัณฑิตวิทยาลัยจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ให้ทุนอุดหนุนในการทำวิจัยนี้

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ที่เคารพรัก และญาติพี่น้องที่รักทุกท่านที่ได้ช่วยเหลือทั้งกำลังกาย กำลังใจ และกำลังทรัพย์ ในระหว่างการศึกษาด้วยดีตลอดมา

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ
กิตติกรรมประกาศ..... ฉ
สารบัญ..... ช
สารบัญตาราง..... ฎ
สารบัญรูป..... ฑ
บทที่ 1 บทนำ..... 1
1. ประวัติความเป็นมา..... 1
2. ชีวเคมีของการผลิตกรดมะนาวโดยยีสต์..... 2
3. ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดมะนาวโดยยีสต์..... 2
3.1 สายพันธุ์ของยีสต์..... 2
3.2 สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาว..... 4
4. การกลายพันธุ์และสิ่งก่อการกลายพันธุ์..... 7
4.1 แสงหรือรังสีต่างๆ ที่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์..... 8
4.2 สารเคมีที่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์..... 8
5. การคัดเลือกสายพันธุ์กลายพันธุ์..... 10
6. การปรับปรุงสายพันธุ์ยีสต์เพื่อผลิตกรดมะนาว..... 11
7. การวิเคราะห์ปริมาณกรดมะนาวและกรดไอโซซิตริก..... 13
8. คุณสมบัติของกรดมะนาว..... 15
9. ประโยชน์ของกรดมะนาว..... 16
10. มูลเหตุจูงใจในการทำวิจัย..... 17
11. ขั้นตอนการวิจัย..... 19

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 2 วิธีการทดลอง..... 20

1. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง..... 20

2. เชื้อจุลินทรีย์..... 23

3. การเก็บรักษาและการเลี้ยงเชื้อ..... 23

3.1 การเก็บรักษาเชื้อ..... 23

3.2 การเตรียมหัวเชื้อ..... 23

3.3 การเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดมะนาว..... 23

4. วิธีการละลายเกลือแคลเซียมซิเตรท ในน้ำหมัก..... 23

5. การกลายพันธุ์ยีสต์ *Candida oleophila* C-73 ด้วยสารชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์..... 24

5.1 การกลายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG..... 24

5.2 การกลายพันธุ์ด้วยแสงอุลตราไวโอเลต..... 25

6. การคัดเลือกยีสต์สายพันธุ์ใหม่..... 25

6.1 การคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ..... 25

6.2 การคัดเลือกขั้นทุติยภูมิ..... 27

7. วิธีการวิเคราะห์..... 27

7.1 การหาน้ำหนักเซลล์แห้ง..... 27

7.2 การหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์..... 27

7.3 การหาปริมาณน้ำตาลกลูโคส โดยใช้ พี.จี.โอ.เอนไซม์..... 28

7.4 การวิเคราะห์กรดมะนาวโดยวิธีเพนตะโบรโมอะซิโตน..... 28

7.5 การวิเคราะห์ปริมาณกรดมะนาวและกรดไอโซซิตริกในน้ำหมัก... 29

บทที่ 3 ผลการทดลอง..... 31

1. การศึกษาประสิทธิภาพในการผลิตกรดมะนาวของ *Candida oleophila* C-73..... 31

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

1.1 การผลิตกรดบนอาหารวุ้น..... 31
1.2 ผลผลิตกรดมะนาวในระดับขวดเขย่า..... 32
2. ประสิทธิภาพการคัดเลือกสายพันธุ์ที่ผลิตกรดมะนาวสูงขึ้นในขั้นปฐมภูมิ เปรียบเทียบกับการวิเคราะห์ปริมาณกรดมะนาวด้วย เพนตะโบรโมอะซิโตน และ HPLC..... 32
3. การปรับปรุงวิธีวิเคราะห์ปริมาณกรดมะนาว และกรดไอโซซิตริก โดยวิธีไฮเพอร์ฟอแมนซ์ลิควิดโครมาโตกราฟฟี..... 38
3.1 การหาสภาวะที่เหมาะสม..... 39
3.2 การหาชนิดของกรดในน้ำหมักและสารละลายมาตรฐานเปรียบเทียบภายใน..... 46
4. การเปรียบเทียบวิธีการกลายพันธุ์ด้วยแสงอุลตราไวโอเลต และสารเคมี NTG เพื่อเลือกใช้เป็นวิธีเริ่มต้นในการปรับปรุงสายพันธุ์ *Candida oleophila* C-73..... 49
4.1 การกลายพันธุ์ด้วยแสงอุลตราไวโอเลตและการคัดเลือกสายพันธุ์. 49
4.2 การกลายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG และการคัดเลือกสายพันธุ์... 56
5. การชักนำให้ *Candida oleophila* เกิดการกลายพันธุ์ซ้ำด้วยสาร NTG. 63
6. การชักนำให้ *Candida oleophila* NN-1 เกิดการกลายพันธุ์ซ้ำ ด้วยแสงอุลตราไวโอเลต..... 68
7. ความเสถียรในการผลิตกรดมะนาวของ *Candida oleophila* สายพันธุ์ตั้งต้นและสายพันธุ์ใหม่ที่คัดเลือกได้..... 73
8. ลักษณะเซลล์ ปริมาณกรดมะนาวและกรดไอโซซิตริก ที่ผลิตโดย *Candida oleophila* สายพันธุ์ C-73 กับสายพันธุ์ NNU-62 ซึ่งเป็นสายพันธุ์กลายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพเพิ่มมากที่สุด โดยเพาะเลี้ยงในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวระดับขวดเขย่า..... 75

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

9. ประสิทธิภาพการผลิตกรดมะนาวของ *Candida oleophila* สายพันธุ์ NNU-62 ในถังหมัก 5 ลิตร 83

บทที่ 4 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง 86

เอกสารอ้างอิง 92

ภาคผนวก

ก สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ 98

ข การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย 100

ค กราฟมาตรฐาน 101

ง การย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์ 104

จ สูตรการคำนวณ 106

ประวัติผู้เขียน 107

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1 รายงานการวิเคราะห์กรด ในสารตัวอย่างชนิดต่างๆ..... 15

2 ปริมาณและมูลค่าการนำเข้ากรดมะนาวของประเทศไทยระหว่างปี 2526-2535. 18

3 ความถี่ของสายพันธุ์ *Candida oleophila* C-73 จำนวน 100 ซ้ำที่ให้ความกว้างบริเวณใสและความกว้างโคโลนีขนาดต่างๆ กัน..... 31

4 ค่า potency index เปรียบเทียบกับปริมาณกรดมะนาวที่วิเคราะห์ด้วยวิธีเพนตะโบรโมอะซิโตน และ HPLC ของสายพันธุ์ทดสอบ 50 สายพันธุ์..... 34

5 เวลาที่อยู่ในคอลัมน์ของกรดมาตรฐานชนิดต่างๆ และน้ำหมัก..... 46

6 เปอร์เซนต์รอดตายภายหลังการฉายแสงอุลตราไวโอเลตที่เวลาต่างๆ เพื่อชักนำให้ *Candida oleophila* C-73 เกิดการกลายพันธุ์ และจำนวนโคโลนีที่คัดเลือกขั้นปฐมภูมิแล้วให้ค่า potency index สูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น..... 50

7 ค่า potency index และปริมาณกรดมะนาว (ครั้งที่ 1) ของ *Candida oleophila* สายพันธุ์ C-73 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ตั้งต้น และเชื้อสายพันธุ์ใหม่ที่คัดเลือกได้ เก็บผลชั่วโมงที่ 96(วิเคราะห์ผลด้วยวิธีเพนตะโบรโมอะซิโตน)... 52

8 ปริมาณการผลิตกรดมะนาว จากการคัดเลือกขั้นทุติยภูมิ(ครั้งที่ 2)ของ *Candida oleophila* สายพันธุ์ C-73 ซึ่งเป็นสายพันธุ์เดิม และเชื้อสายพันธุ์ใหม่ที่มีผลผลิตกรดมะนาวมากกว่าสายพันธุ์เดิม เก็บผลชั่วโมงที่ 96(วิเคราะห์ผลด้วยวิธี HPLC)..... 54

9 ปริมาณการผลิตกรดมะนาว จากการคัดเลือกขั้นทุติยภูมิ(ครั้งที่ 3)ของ *Candida oleophila* สายพันธุ์ C-73 ซึ่งเป็นสายพันธุ์เดิม และเชื้อสายพันธุ์ใหม่ที่มีผลผลิตกรดมะนาวมากกว่าสายพันธุ์เดิม เก็บผลชั่วโมงที่ 96(วิเคราะห์ผลด้วยวิธี HPLC)..... 55

10 เปอร์เซนต์รอดตายภายหลังการเติม NTG ความเข้มข้นต่างๆ เพื่อชักนำให้ *Candida oleophila* C-73 เกิดการกลายพันธุ์ และจำนวนโคโลนี ที่คัดเลือกขั้นปฐมภูมิแล้วให้บริเวณใสรอบๆโคโลนี กว้างกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น..... 57

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

11 ค่า potency index และปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้ (ครั้งที่ 1) ของ *Candida oleophila* สายพันธุ์ C-73 และสายพันธุ์ใหม่ที่คัดเลือกได้ เก็บผลชั่วโมงที่ 96(วิเคราะห์ผลด้วยวิธีเพนตะโบรโมอะซิโตน)..... 59

12 ปริมาณกรดมะนาวและกรดไอโซซิตริกที่ผลิตได้ น้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือในน้ำหมักจากการคัดเลือกขั้นทุติยภูมิ (ครั้งที่ 2) ของ *Candida oleophila* สายพันธุ์ C-73 และสายพันธุ์ใหม่ที่ผ่านการคัดเลือกครั้งที่ 1 เก็บผลชั่วโมงที่ 96(วิเคราะห์ผลด้วยวิธี HPLC)..... 61

13 ปริมาณกรดมะนาวและกรดไอโซซิตริกที่ผลิตได้ น้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือในน้ำหมักจากการคัดเลือกขั้นทุติยภูมิ (ครั้งที่ 3) ของ *Candida oleophila* สายพันธุ์ C-73 และสายพันธุ์ใหม่ที่ผ่านการคัดเลือกครั้งที่ 1 เก็บผลชั่วโมงที่ 96(วิเคราะห์ผลด้วยวิธี HPLC)..... 62

14 เปอร์เซนต์รอด และจำนวนสายพันธุ์ใหม่ที่มีประสิทธิภาพการผลิตกรดสูงขึ้น จากการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ..... 63

15 ค่า potency index และปริมาณกรดมะนาว (ครั้งที่ 1) ของ *Candida oleophila* สายพันธุ์ N-57 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ตั้งต้น และเชื้อสายพันธุ์ใหม่ที่คัดเลือกได้ เก็บผลชั่วโมงที่ 96(วิเคราะห์ด้วยวิธีเพนตะโบรโมอะซิโตน)..... 64

16 ปริมาณการผลิตกรดมะนาว,กรดไอโซซิตริก และน้ำตาลรีดิวซ์ จากการคัดเลือกขั้นทุติยภูมิ(ครั้งที่ 2) ของสายพันธุ์ *Candida oleophila* N-57 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ตั้งต้น และเชื้อสายพันธุ์ใหม่ เก็บผลชั่วโมงที่ 96 (วิเคราะห์ผลด้วยวิธี HPLC)..... 66

17 ปริมาณการผลิตกรดมะนาว,กรดไอโซซิตริก และน้ำตาลรีดิวซ์ จากการคัดเลือกขั้นทุติยภูมิ(ครั้งที่ 3) ของสายพันธุ์ *Candida oleophila* N-57 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ตั้งต้น และเชื้อสายพันธุ์ใหม่ เก็บผลชั่วโมงที่ 96 (วิเคราะห์ผลด้วยวิธี HPLC)..... 67

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

18 เปอร์เซนต์รอด และจำนวนสายพันธุ์ใหม่ที่มีประสิทธิภาพการผลิตกรดสูงขึ้น จากการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ..... 68

19 ค่า potency index และปริมาณกรดมะนาว ของ *Candida oleophila* สายพันธุ์ NN-1 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ตั้งต้น และเชื้อสายพันธุ์ใหม่ที่คัดเลือกได้ เก็บผลชั่วโมงที่ 96 (วิเคราะห์ด้วยวิธีเพนตะโบรโมอะซิโตน) เมื่อใช้แป้งที่ย่อยแล้วคิดเป็นน้ำตาลกลูโคส 200 และแคลเซียมคาร์บอเนต 100 กรัมต่อลิตร..... 70

20 ปริมาณกรดมะนาวและกรดไอโซซิตริก ผลิตโดย *Candida oleophila* สายพันธุ์ NN-1 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ตั้งต้นและเชื้อสายพันธุ์ใหม่ เก็บผลชั่วโมงที่ 96(วิเคราะห์ผลด้วยวิธี HPLC เมื่อใช้แป้งที่ย่อยแล้วคิดเป็นน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น 200 และแคลเซียมคาร์บอเนต 110 กรัมต่อลิตร และ pH เริ่มต้น 6.78..... 71

21 ปริมาณกรดมะนาวและกรดไอโซซิตริก ผลิตโดย *Candida oleophila* สายพันธุ์ NN-1 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ตั้งต้นและเชื้อสายพันธุ์ใหม่ เก็บผลชั่วโมงที่ 96 (วิเคราะห์ผลด้วยวิธี HPLC) เมื่อใช้แป้งที่ย่อยแล้วคิดเป็นน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น 220 และแคลเซียมคาร์บอเนต 120 กรัมต่อลิตร และ pH เริ่มต้น 6.78.... 72

22 ผลผลิตกรดมะนาวของ *Candida oleophila* สายพันธุ์ตั้งต้นและสายพันธุ์ใหม่ที่คัดเลือกได้ในแต่ละครั้งของการกลายพันธุ์..... 73

23 ผลการเพาะเลี้ยง *Candida oleophila* สายพันธุ์ C-73 ในอาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะที่กำหนด ระดับขวดเขย่า..... 76

24 ผลการเพาะเลี้ยง *Candida oleophila* สายพันธุ์ NNU-62 ในอาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะที่กำหนด ระดับขวดเขย่า..... 77

25 ผลการเพาะเลี้ยง *Candida oleophila* สายพันธุ์ NNU-62 ในอาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะที่กำหนด ระดับถังหมัก 5 ลิตร..... 84

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	แสดงขั้นตอนของการสร้างกรดมะนาวจากน้ำตาล ซึ่งผ่านกลไกไกลโคไลซิส (glycolysis) และอยู่ในวัฏจักรเครปส์(Krebs cycle).....	3
2	สูตรโครงสร้างทางเคมีของ NIG.....	9
3	โครงสร้างของกรดมะนาว.....	16
4	อาหารวุ้นที่มีแคลเซียมคาร์บอเนตเป็นอินดิเคเตอร์.....	26
5	การเรียงแผ่นกระจกที่มีอาหารวุ้น ในกล่องแสตนเลสที่มีฝาปิด.....	26
6	ความกว้างของบริเวณใสรอบๆ โคโลนี.....	27
7	ความสัมพันธ์ของปริมาณกรดมะนาวที่ได้จากการวิเคราะห์ ด้วยวิธีเพนตะโบรโม-อะซิโตน กับ HPLC.....	37
8	ความสัมพันธ์ของค่า potency index กับปริมาณกรดมะนาวที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC.....	38
9	โครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน และน้ำหมัก เมื่อใช้คอลัมน์ C8 และ C18...	40
10	โครมาโตแกรมสารมาตรฐาน(10ก) และน้ำหมัก(10ข) เมื่อใช้สารละลายตัวพาที่ไม่เติมอะซิโตไนทริล.....	41
11	โครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน และน้ำหมัก เมื่อใช้สารละลายตัวพาที่มีค่าความเป็นกรดด่าง เท่ากับ 2.40 และ 2.00.....	43
12	โครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน และน้ำหมัก เมื่อเพิ่มอุณหภูมิของคอลัมน์เป็น 40 องศาเซลเซียส.....	44
13	สเปคตรัมของสารมาตรฐาน และน้ำหมักที่ความยาวคลื่น 190-400 นาโนเมตร.	44
14	โครมาโตแกรมของสารละลายผสมของกรดชนิดต่างๆ.....	47
15	โครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน และน้ำหมัก ที่เติมกรดทาร์ทาริกเป็นสารมาตรฐานเปรียบเทียบภายใน.....	48

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
16	ความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซนต์รอดของ *Candida oleophila* สายพันธุ์ C-73 กับระยะเวลาในการฉายแสงอุลตราไวโอเลต เพื่อให้เกิดการกลายพันธุ์.....	51
17	ความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซนต์รอดของ *Candida oleophila* สายพันธุ์ C-73 กับความเข้มข้นของสารเคมี NTG.....	58
18	ผลผลิตกรดมะนาวของสายพันธุ์ตั้งต้นและสายพันธุ์ใหม่ 4 สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้จากการเพาะเลี้ยง 5 ครั้ง เก็บผลชั่วโมงที่ 96 ของการเพาะเลี้ยง และวิเคราะห์ผลด้วย HPLC.....	74
19	การเจริญและการผลิตกรดมะนาวของ *Candida oleophila* สายพันธุ์ C-73 ในระดับขวดเขย่า.....	78
20	การเจริญและการผลิตกรดมะนาวของ *Candida oleophila* สายพันธุ์ NNU-62 ในระดับขวดเขย่า.....	78
21	กรดมะนาวที่ผลิตได้จากสายพันธุ์ C-73 และ NNU-62 ในระดับขวดเขย่า.....	79
22	ลักษณะเซลล์ของสายพันธุ์ C-73 และ NNU-62 ที่เวลาต่างๆของการเพาะเลี้ยง	80
23	การเจริญและการผลิตกรดมะนาวของ *Candida oleophila* สายพันธุ์ NNU-62 ในถังหมัก 5 ลิตร.....	85
24	กราฟมาตรฐานของน้ำตาลรีดิวซ์.....	101
25	กราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส.....	102
26	กราฟมาตรฐานของกรดมะนาว จากวิธีเพนตะโบรโมอะซิโตน.....	102
27	กราฟมาตรฐานของกรดมะนาว จากวิธี HPLC.....	103
28	กราฟมาตรฐานของกรดไอโซซิตริก จากวิธี HPLC.....	103
29	เปอร์เซนต์สมมูลเดกซ์โทรส และกลูโคส ของแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ ที่เวลาต่างๆ.....	105