

การผลิตกรดมาลิกด้วยกากน้ำตาลอ้อยโดย

Acetobacter sp. BX2

PRODUCTION OF MALIC ACID FROM SUGAR CANE

MOLASSES BY *Acetobacter* sp. BX2



โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเอกสารฉบับนี้ **ปีการศึกษา 2561** ถึงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

PRODUCTION OF MALIC ACID FROM SUGAR CANE
MOLASSES BY *Acetobacter* sp. BX2



A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENT FOR

THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE

(INDUSTRIAL MICROBIOLOGY)

DEPARTMENT OF BIOLOGY, FACULTY OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

ACADEMIC YEAR 2018

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ การผลิตกรดมาลิกด้วยกากน้ำตาลอ้อยโดย *Acetobacter* sp. BX2
Production of Malic Acid from Sugar Cane Molasses by
Acetobacter sp. BX2

ชื่อนักศึกษา นางสาวประภาสา งามแก้ว รหัสนักศึกษา 58050923
นางสาวศิริวรรณ แนนอุดร รหัสนักศึกษา 58050984
นางสาวศิริวรรณ เสาตรง รหัสนักศึกษา 58050985

ปริญญา วิทยาศาสตร์บัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)

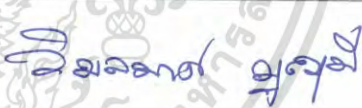

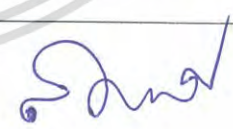
ภาควิชา ชีววิทยา

คณะ วิทยาศาสตร์

ปีการศึกษา 2561

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร.สมพิศ สอนโยธา

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้
โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต จุลชีววิทยา
อุตสาหกรรม ประจำปีการศึกษา 2561

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ดร.วิมลมาศ บุญมี ประธานกรรมการ	
ผศ.ดร.สุทธิจิต ศรีวัชรกุล กรรมการ	
ผศ.ดร.สมพิศ สอนโยธา กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้งานเพื่อการศึกษานั้น ไม่นอนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ	การผลิตกรดมาลิกด้วยกากน้ำตาลอ้อยโดย <i>Acetobacter</i> sp. BX2		
ชื่อนักศึกษา	นางสาวประภาสา	งามแก้ว	รหัสนักศึกษา 58050923
	นางสาวศิริวรรณ	แน่นอุดร	รหัสนักศึกษา 58050984
	นางสาวศิริวรรณ	เสาดรง	รหัสนักศึกษา 58050985
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)		
ภาควิชา	ชีววิทยา		
คณะ	วิทยาศาสตร์		
มหาวิทยาลัย	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง		
ปีการศึกษา	2561		
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร.สมพิศ สอนโยธา		

บทคัดย่อ

โครงการพิเศษนี้ศึกษาการผลิตแกลเซียมมาเลต (เกลือแกลเซียมของกรดมาลิก) ด้วย *Acetobacter* sp. BX2 โดยใช้กากน้ำตาลอ้อยซึ่งเป็นวัตถุดิบที่มีราคาถูกเป็นแหล่งคาร์บอน จากการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณน้ำตาลในกากน้ำตาลอ้อย พบว่ากากน้ำตาลอ้อยประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส ฟรุกโตส และซูโครสเท่ากับ 78.31 131.48 และ 296.21 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อทำการเพาะเลี้ยง *Acetobacter* sp. BX2 ในอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคส ฟรุกโตส หรือน้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า *Acetobacter* sp. BX2 สามารถใช้น้ำตาลทั้งสามชนิดในการผลิตแกลเซียมมาเลตได้ อย่างไรก็ตามในการหมักมีอัตราการผลิตลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อนำน้ำตาลซูโครสหรือฟรุกโตสเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อเทียบกับการใช้น้ำตาลกลูโคส และได้เปรียบเทียบปริมาณแกลเซียมมาเลตที่ได้จากการใช้กากน้ำตาลอ้อยที่ไม่ปรับสภาพและกากน้ำตาลอ้อยที่ปรับสภาพด้วยวิธีต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยง *Acetobacter* sp. BX2 ในอาหารที่ใช้กากน้ำตาลอ้อยที่ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกและแกลเซียมไฮดรอกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอนสามารถผลิตแกลเซียมมาเลตได้ดีที่สุดเท่ากับ 24.20 ± 1.46 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้ยังพบว่าสามารถผลิตแกลเซียมมาเลตได้สูงถึง 38.25 ± 0.88 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลา 144 ชั่วโมง เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีกากน้ำตาลอ้อยที่ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกและแกลเซียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 200 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และมี corn steep liquor ความเข้มข้นร้อยละ 0.25 โดยปริมาตร เป็นแหล่งไนโตรเจน ซึ่งมีผลได้เท่ากับ 0.93 ± 0.02 กรัมต่อกรัม มีการใช้น้ำตาลร้อยละ 12.80 และมีอัตราการผลิตสูงสุดเท่ากับ 0.49 ± 0.01 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าสามารถใช้กากน้ำตาลอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตกรดมาลิกโดย *Acetobacter* sp. ได้อย่างมีประสิทธิภาพ อีกทั้งยังเป็นการลดต้นทุนในการผลิตกรดมาลิกได้อีกด้วย

คำสำคัญ : กากน้ำตาลอ้อย การปรับสภาพ กรดมาลิก แกลเซียมมาเลต แหล่งคาร์บอน

เอกสารนี้เป็นเอกสารต้นฉบับของ *Acetobacter* sp. BX2 ศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Production of Malic Acid from Sugar Cane Molasses by <i>Acetobacter</i> sp. BX2
Students	Miss Prapasa Ngamkeaw Student ID 58050923 Miss Siriwan Naeaudon Student ID 58050984 Miss Siriwan Saotrong Student ID 58050985
Degree	Bachelor of Science (Industrial Microbiology)
Department	Biology
Faculty	Science
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)
Academic Year	2018
Advisor	Asst. Prof. Dr. Somphit Sornyotha

Abstract

In this special project, production of calcium malate (a calcium salt of malic acid) by *Acetobacter* sp. BX2 using sugarcane molasses as a cheap carbon source was studied. The sugar content in molasses were analyzed. The result found that the molasses consists of glucose, fructose and sucrose at 78.31, 131.48 and 296.21 g/L, respectively. *Acetobacter* sp. BX2 was cultured in medium containing glucose, fructose or sucrose as carbon source, and calcium malate production from these sugars was monitored. The results showed that all three sugars tested could be readily converted to calcium malate. However, the fermentation had a significantly lower productivity with sucrose and fructose as compared to glucose. The calcium malate content fermented utilizing untreated molasses and various pretreated molasses as carbon sources are compared. Calcium malate produced by *Acetobacter* sp. BX2 using molasses pretreated with sulfuric acid and calcium hydroxide as a carbon source is the highest which are 24.20 ± 1.46 g/L. In addition, calcium malate concentration of 38.25 ± 0.88 g/L was attained at 144 h using an optimum medium containing molasses pretreated with sulfuric acid and calcium hydroxide of 200 g/L and corn steep liquor 0.25% (v/v), resulting in a calcium malate yield of 0.93 ± 0.02 g/g and sugar utilization of 12.80 % and a maximum productivity of 0.49 ± 0.01 g/(L.h) at 48 h. This study suggests that the inexpensive sugarcane molasses could be utilized for the economical and efficient production of malic acid by *Acetobacter* sp. BX2.

Keywords : Sugar cane molasses, Pretreatment, Malic acid, Calcium malate, Carbon source, Nitrogen source, *Acetobacter* sp. BX2

กิตติกรรมประกาศ

โครงการพิเศษฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ต้องขอบคุณความกรุณาและคำแนะนำของทุกท่าน ขอขอบพระคุณอาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร.สมพิศ สอนโยธา อาจารย์ประจำภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่คอยให้คำปรึกษาดูแล แนะนำแนวทางที่ดีในการปรับปรุงข้อบกพร่องในการทำโครงการพิเศษ ตลอดจนให้ความรู้และประสบการณ์ต่างๆ คณะผู้จัดทำจึงขอกราบขอบพระคุณ มา ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณท่านอาจารย์ประธานกรรมการสอบโครงการพิเศษ ดร.วิมลมาศ บุญมี และท่านอาจารย์กรรมการสอบโครงการพิเศษ ผศ.ดร.สุทธิจิต ศรีวัชรกุล อาจารย์ประจำภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ให้คำแนะนำ ตรวจสอบ พร้อมทั้งชี้แนะแนวทางในการทำโครงการพิเศษฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการวิทยาศาสตร์ เจ้าหน้าที่ห้องธุรการ เจ้าหน้าที่ฝ่ายอาคารสถานที่ ตลอดจนแม่บ้านประจำทุกท่าน ที่อำนวยความสะดวกในด้านอุปกรณ์ สารเคมี การติดต่อประสานงานและด้านสถานที่ในการทำโครงการพิเศษฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณบิดา มารดา เพื่อน พี่ น้อง และทุกๆ คนที่คอยให้ความช่วยเหลือ กำลังใจและคำแนะนำต่างๆ ตลอดจนโครงการพิเศษฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สุดท้ายนี้คณะผู้จัดทำหวังเป็นอย่างยิ่งว่าโครงการพิเศษฉบับนี้ จะเป็นประโยชน์สำหรับผู้สนใจศึกษาข้อมูลที่เกี่ยวข้องทางด้านนี้ หากโครงการพิเศษนี้มีข้อผิดพลาดประการใด ทางคณะผู้จัดทำขออภัยมา ณ โอกาสนี้ด้วย

ประกาศา งามแก้ว

ศิริวรรณ แน่นอุดร

ศิริวรรณ เสาตรง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

(ต่อ)

หน้า

2.5 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดมาลิก.....	16
2.5.1 ชนิดของจุลินทรีย์.....	16
2.5.2 ชนิดของแหล่งคาร์บอน.....	17
2.5.3 อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C:N ratio).....	20
2.6 การประยุกต์ใช้กรดมาลิก.....	20
2.6.1 อุตสาหกรรมอาหาร.....	20
2.6.2 อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง.....	20
2.6.3 อุตสาหกรรมสิ่งทอ.....	20
2.6.4 อุตสาหกรรมเกษตร.....	21
2.6.5 อุตสาหกรรมยา.....	21
2.7 กากน้ำตาล.....	21
2.7.1 การปรับสภาพกากน้ำตาล.....	22
2.7.1.1 การตกตะกอนร่วมกับไฮดรอกไซด์.....	22
2.7.1.2 การตกตะกอนร่วมกับซัลไฟต์.....	23
2.7.1.3 การตกตะกอนด้วยคิเลต.....	23
2.7.1.4 การแลกเปลี่ยนไอออน (ion exchange).....	23
2.7.1.5 การดูดซับด้วยถ่านกัมมันต์.....	24
2.7.1.6 ตัวดูดซับต้นทุนต่ำ.....	24
2.7.1.7 การกรองด้วยอัลตราฟิวเตรชั่น.....	24
2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	25
2.8.1 การผลิตกรดพอลิมาลิกจาก <i>Aureobasidium pullulans</i> โดยใช้ กากน้ำตาลถั่วเหลืองเป็นแหล่งคาร์บอน.....	25
2.8.2 การผลิตกรดพอลิมาลิกและกรดมาลิกจากน้ำตาลไซโลสและซังข้าวโพดที่ผ่าน การย่อยสลายโดย <i>Aureobasidium pullulans</i> สายพันธุ์ YJ6-11.....	26

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

(ต่อ)

หน้า

2.8.3 การผลิตออโรนิตินจากกากน้ำตาลอ้อยด้วย <i>Corynebacterium glutamicum</i> โดยการหมักแบบต่อเนื่อง.....	26
บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย.....	28
3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์.....	28
3.2 สารเคมี.....	29
3.3 ขั้นตอนการดำเนินงาน.....	30
3.3.1 แบคทีเรียที่ใช้ศึกษา.....	30
3.3.2 การกระตุ้นเชื้อและการเตรียมหัวเชื้อ.....	30
3.3.3 การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบของกากน้ำตาลอ้อย.....	31
3.3.4 วิธีการปรับสภาพกากน้ำตาลอ้อย.....	31
3.3.4.1 การปรับสภาพกากน้ำตาลอ้อยด้วยกรดซัลฟูริก.....	31
3.3.4.2 การปรับสภาพกากน้ำตาลอ้อยด้วยถ่านกัมมันต์.....	31
3.3.4.3 การปรับสภาพกากน้ำตาลอ้อยด้วยแคลเซียมไฮดรอกไซด์.....	31
3.3.4.4 การปรับสภาพกากน้ำตาลอ้อยด้วยโพแทสเซียมเพอร์โร-ไฮยาไนต์.....	32
3.3.4.5 การปรับสภาพกากน้ำตาลอ้อยด้วยกรดซัลฟูริกและแคลเซียมไฮดรอกไซด์.....	32
3.3.5 การศึกษาผลของการใช้น้ำตาลกลูโคส ฟรุกโตส และซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตแคลเซียมมาเลตโดย <i>Acetobacter</i> sp. BX2.....	32
3.3.6 การศึกษาผลของการใช้กากน้ำตาลอ้อยที่ปรับสภาพด้วยวิธีต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตแคลเซียมมาเลตโดย <i>Acetobacter</i> sp. BX2.....	33

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

(ต่อ)

หน้า

3.3.7 การศึกษาผลของการใช้กากน้ำตาลอ้อยที่ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกและ แคลเซียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันเป็นแหล่งคาร์บอนใน การผลิตแคลเซียมมาเลตโดย <i>Acetobacter</i> sp. BX2.....	33
3.3.8 การศึกษาผลของการใช้แหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้นแตกต่างกันใน การผลิตแคลเซียมมาเลตโดย <i>Acetobacter</i> sp. BX2.....	34
3.3.9 การศึกษาการผลิตและอัตราการผลิตแคลเซียมมาเลตโดย <i>Acetobacter</i> sp. BX2 เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหาร calcium malate production ที่มี กากน้ำตาลอ้อยที่ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกและแคลเซียมไฮดรอกไซด์ความ เข้มข้น 200 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และมี corn steep liquor ความเข้มข้นร้อยละ 0.25 โดยปริมาตร เป็นแหล่งไนโตรเจน.....	34
3.3.10 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธีดีเอ็นเอส.....	35
3.3.11 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธีฟีนอลซัลฟูริก.....	35
3.3.12 การวิเคราะห์ปริมาณกรดมาลิก.....	36
3.3.12.1 การตกตะกอนแคลเซียมมาเลต.....	36
3.3.12.2 การวิเคราะห์ปริมาณแคลเซียมมาเลตด้วยวิธีการไทเทรต.....	36
3.3.13 การวิเคราะห์เพื่อเปรียบเทียบค่าทางสถิติด้วยโปรแกรม Minitab 18.....	36
บทที่ 4 ผลการทดลองและการอภิปรายผล.....	37
4.1 ผลของการใช้น้ำตาลกลูโคส ฟรุกโตส และซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิต แคลเซียมมาเลตโดย <i>Acetobacter</i> sp. BX2.....	37
4.2 ผลของการใช้กากน้ำตาลอ้อยที่ปรับสภาพด้วยวิธีต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิต แคลเซียมมาเลตโดย <i>Acetobacter</i> sp. BX2.....	41
4.3 ผลของการใช้กากน้ำตาลอ้อยที่ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกและแคลเซียมไฮดรอกไซด์ที่ ความเข้มข้นแตกต่างกันเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตแคลเซียมมาเลต โดย <i>Acetobacter</i> sp. BX2.....	47

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

(ต่อ)

หน้า

4.4 ผลของการใช้แหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้นแตกต่างกันในการผลิตแคลเซียมมาเลต โดย <i>Acetobacter</i> sp. BX2.....	52
4.5 ผลของการผลิตและอัตราการผลิตแคลเซียมมาเลตโดย <i>Acetobacter</i> sp. BX2 เมื่อทำ การเพาะเลี้ยงในอาหาร calcium malate production ที่มีกากน้ำตาลอ้อยที่ปรับ สภาพด้วยกรดซัลฟูริกและแคลเซียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 200 กรัมต่อลิตร เป็น แหล่งคาร์บอน และมี corn steep liquor ความเข้มข้นร้อยละ 0.25 โดยปริมาตร เป็นแหล่งไนโตรเจน.....	57
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	62
5.1 สรุปผลการวิจัย.....	62
5.2 ข้อเสนอแนะ.....	62
เอกสารอ้างอิง.....	63
ภาคผนวก.....	71
ภาคผนวก ก สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ.....	72
ภาคผนวก ข การเตรียมสารละลายสำหรับการวิเคราะห์ทางเคมี.....	73
ภาคผนวก ค การคำนวณที่เกี่ยวข้อง.....	79
ภาคผนวก ง การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ.....	94
ภาคผนวก จ รูปตัวอย่างตะกอนแคลเซียมมาเลต.....	100

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 แสดงตัวอย่างของจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตกรดมาลิกได้.....	17
2.2 แสดงการผลิตกรดมาลิกจากจุลินทรีย์โดยใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ.....	18
2.3 แสดงส่วนประกอบของกากน้ำตาลอ้อย.....	22
2.4 แสดงการผลิตออร์นิตินโดยกากน้ำตาลอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพด้วยวิธีที่แตกต่างกันเป็นแหล่งคาร์บอน.....	27
4.1 แสดงผลของการใช้น้ำตาลกลูโคส ฟรุคโตส และซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนต่อปริมาณแคลเซียมมาเลต ผลได้ และอัตราการผลิตของเชื้อ <i>Acetobacter</i> sp. BX2.....	39
4.2 แสดงปริมาณแคลเซียมมาเลต ผลได้ และอัตราการผลิตของเชื้อ <i>Acetobacter</i> sp. BX2 เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหารที่ใช้กากน้ำตาลอ้อยที่ปรับสภาพด้วยวิธีต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอน.....	44
4.3 แสดงปริมาณแคลเซียมมาเลต ผลได้ และอัตราการผลิตของเชื้อ <i>Acetobacter</i> sp. BX2 เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหารที่ใช้กากน้ำตาลอ้อยที่ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกและแคลเซียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันเป็นแหล่งคาร์บอน.....	51
4.4 แสดงปริมาณแคลเซียมมาเลต ผลได้ และอัตราการผลิตของเชื้อ <i>Acetobacter</i> sp. BX2 เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหารที่ใช้ corn steep liquor ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันเป็นแหล่งไนโตรเจน.....	55
4.5 แสดงปริมาณแคลเซียมมาเลต ผลได้ และอัตราการผลิตของเชื้อ <i>Acetobacter</i> sp. BX2 โดยใช้น้ำตาลอ้อยที่ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกและแคลเซียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้น 200 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และใช้ corn steep liquor ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.25 โดยปริมาตร เป็นแหล่งไนโตรเจน.....	60
ข.1 แสดงการเตรียมสารละลายน้ำตาลกลูโคสหรือสารละลายโซโลสมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ.....	73
ข.2 แสดงการเตรียมสารละลายน้ำตาลกลูโคสหรือสารละลายโซโลสมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ.....	73
ค.1 แสดงพื้นที่ใต้กราฟ และค่า Retention time เมื่อทำการวิเคราะห์น้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยเครื่อง HPLC ด้วยคอลัมน์วิเคราะห์ ชนิด BP-800 Ca++ Carbohydrate.....	79
ค.2 แสดงพื้นที่ใต้กราฟ และค่า Retention time เมื่อทำการวิเคราะห์น้ำตาลฟรุคโตสที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยเครื่อง HPLC ด้วยคอลัมน์วิเคราะห์ ชนิด BP-800 Ca++ Carbohydrate.....	81

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนำไปเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาตให้ถือว่าผิดกฎหมาย

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

(ต่อ)

ตารางที่	หน้า
ค.3 แสดงพื้นที่ใต้กราฟ และค่า Retention time เมื่อทำการวิเคราะห์น้ำตาลซูโครสที่ความเข้มข้น ต่างๆ โดยเครื่อง HPLC ด้วยคอลัมน์วิเคราะห์ ชนิด BP-800 Ca++ Carbohydrate.....	83
ค.4 แสดงปริมาณน้ำตาลที่เหลือ ปริมาณแคลเซียมมาเลต ผลได้ และอัตราการผลิต เมื่อทำการ เพาะเลี้ยง <i>Acetobacter</i> sp. BX2 โดยใช้น้ำตาลกลูโคส และฟรุกโตสเป็นแหล่งคาร์บอน ตามลำดับ.....	87
ค.5 แสดงปริมาณน้ำตาลซูโครสที่เหลือ ปริมาณแคลเซียมมาเลต ผลได้ และอัตราการผลิต เมื่อทำการเพาะเลี้ยง <i>Acetobacter</i> sp. BX2 โดยใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน.....	87
ค.6 แสดงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ ปริมาณแคลเซียมมาเลต ผลได้ และอัตราการผลิต เมื่อทำการเพาะเลี้ยง <i>Acetobacter</i> sp. BX2 โดยใช้กากน้ำตาลอ้อยที่ปรับสภาพด้วยวิธีต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอน ตามลำดับ.....	88
ค.7 แสดงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ ปริมาณแคลเซียมมาเลต ผลได้ และอัตราการผลิต เมื่อทำการเพาะเลี้ยง <i>Acetobacter</i> sp. BX2 โดยใช้กากน้ำตาลอ้อยที่ปรับสภาพด้วย กรดซัลฟูริกและแคลเซียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันเป็นแหล่งคาร์บอน ตามลำดับ.....	90
ค.8 แสดงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ ปริมาณแคลเซียมมาเลต ผลได้ และอัตราการผลิต เมื่อทำการเพาะเลี้ยง <i>Acetobacter</i> sp. BX2 โดยใช้ corn steep liquor ที่ความเข้มข้น แตกต่างกันเป็นแหล่งไนโตรเจนตามลำดับ.....	91
ค.9 แสดงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ ปริมาณแคลเซียมมาเลต ผลได้ และอัตราการผลิต เมื่อทำการเพาะเลี้ยง <i>Acetobacter</i> sp. BX2 โดยใช้กากน้ำตาลอ้อยที่ปรับสภาพด้วย กรดซัลฟูริกและแคลเซียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้น 200 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และใช้ corn steep liquor ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.25 โดยปริมาตร เป็นแหล่งไนโตรเจน ตามลำดับ.....	93
ง.1 แสดงการวิเคราะห์ค่าทางสถิติของปริมาณแคลเซียมมาเลต ผลได้ และอัตราการผลิต ด้วย <i>Acetobacter</i> sp. BX2 โดยใช้น้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบของกากน้ำตาลอ้อยเป็น แหล่งคาร์บอน.....	94

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

(ต่อ)

ตารางที่	หน้า
ง.2 แสดงการเปรียบเทียบปริมาณแคลเซียมมาเลต ผลได้ และอัตราการผลิต ด้วย <i>Acetobacter</i> sp. BX2 โดยใช้น้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบของกากน้ำตาลอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอน ด้วยวิธีของ Duncan ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05.....	94
ง.3 แสดงการวิเคราะห์ค่าทางสถิติของปริมาณแคลเซียมมาเลต ผลได้ และอัตราการผลิต ด้วย <i>Acetobacter</i> sp. BX2 โดยใช้กากน้ำตาลที่อ้อยไม่ปรับสภาพและกากน้ำตาลอ้อยที่ปรับสภาพด้วยวิธีต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอน.....	95
ง.4 แสดงการวิเคราะห์ค่าทางสถิติของปริมาณแคลเซียมมาเลต ผลได้ และอัตราการผลิต ด้วย <i>Acetobacter</i> sp. BX2 โดยใช้กากน้ำตาลที่อ้อยไม่ปรับสภาพและกากน้ำตาลอ้อยที่ปรับสภาพด้วยวิธีต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอน.....	95
ง.5 แสดงการวิเคราะห์ค่าทางสถิติของปริมาณแคลเซียมมาเลต ผลได้ และอัตราการผลิต ด้วย <i>Acetobacter</i> sp. BX2 โดยใช้กากน้ำตาลอ้อยที่ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกและแคลเซียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันเป็นแหล่งคาร์บอน.....	96
ง.6 แสดงการวิเคราะห์ค่าทางสถิติของปริมาณแคลเซียมมาเลต ผลได้ และอัตราการผลิต ด้วย <i>Acetobacter</i> sp. BX2 โดยใช้กากน้ำตาลอ้อยที่ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกและแคลเซียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันเป็นแหล่งคาร์บอน ด้วยวิธีของ Duncan ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05.....	96
ง.7 แสดงการวิเคราะห์ค่าทางสถิติของปริมาณแคลเซียมมาเลต ผลได้ และอัตราการผลิต ด้วย <i>Acetobacter</i> sp. BX2 โดยใช้กากน้ำตาลอ้อยที่ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกและแคลเซียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้น 200 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และใช้ corn steep liquor ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันเป็นแหล่งไนโตรเจน.....	97
ง.8 แสดงการวิเคราะห์ค่าทางสถิติของปริมาณแคลเซียมมาเลต ผลได้ และอัตราการผลิต ด้วย <i>Acetobacter</i> sp. BX2 โดยใช้กากน้ำตาลอ้อยที่ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกและแคลเซียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้น 200 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และใช้ corn steep liquor ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันเป็นแหล่งไนโตรเจน ด้วยวิธีของ Duncan ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05.....	98

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
<p>ง.9 แสดงการวิเคราะห์ค่าทางสถิติของปริมาณแคลเซียมมาเลต ผลได้ และอัตราการผลิต ด้วย <i>Acetobacter</i> sp. BX2 โดยใช้กากน้ำตาลอ้อยที่ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกและ แคลเซียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้น 200 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และใช้ corn steep liquor ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.25 โดยปริมาตร เป็นแหล่งไนโตรเจน.....</p>	98
<p>ง.10 แสดงการวิเคราะห์ค่าทางสถิติของปริมาณแคลเซียมมาเลต ผลได้ และอัตราการผลิต ด้วย <i>Acetobacter</i> sp. BX2 โดยใช้กากน้ำตาลอ้อยที่ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริก และแคลเซียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้น 200 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และใช้ corn steep liquor ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.25 โดยปริมาตร เป็นแหล่งไนโตรเจน ด้วยวิธีของ Duncan ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05.....</p>	99

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 แสดงลักษณะรูปร่างของ <i>Acetobacter</i> sp.	4
2.2 แสดงโครงสร้างของ L และ D form ของกรดมาลิก.....	5
2.3 แสดงปฏิกิริยาการสังเคราะห์กรดมาลิกด้วยกระบวนการทางเคมี หมายเหตุ (MA) คือ มาเลอิกแอนไฮไดรด์ (maleic anhydride) (Mx) คือ กรดมาเลอิก (maleic acid) (F) คือ กรดฟูมาริก (fumaric acid) และ (M) คือ กรดมาลิก (malic acid)	6
2.4 วิถีไกลโคไลซิส (glycolysis pathway).....	9
2.5 วิถีเพนโตสฟอสเฟต (pentose phosphate pathway).....	11
2.6 (I) Direct reduction of oxaloacetate (II) วัฏจักรกรดไตรคาร์บอกซิลิก (Tricarboxylic acid, TCA cycle) (III) วัฏจักรไกลออกซีเลต (Glyoxylate cycle) (IV) วัฏจักรไกลออกซีเลตแบบไม่เต็มวง (Noncyclic glyoxylate) หมายเหตุ : AKG คือ แอลฟา-คีโตกลูตาเลต (α -ketoglutarate) CIT คือ ซิเตรต (citrate) FUM คือ ฟูมาเรต (fumarate) ICI คือ ไอโซซิเตรต (isocitrate) Mal คือ มาเลต (malate) OAA คือ ออกซาโลอะซิเตต (oxaloacetate) SUC คือ ซัคซิเนต (succinate) SUCC คือ ซัคซินิลโคเอ (succinyl-CoA) Y_{sp}^{max} คือ ผลผลิตสูงสุดตามทฤษฎี (โมลมาเลตต่อโมลกลูโคส).....	12
2.7 วัฏจักรกรดไตรคาร์บอกซิลิก (Tricarboxylic acid, TCA cycle).....	14
2.8 วัฏจักรไกลออกซีเลต (Glyoxylate cycle).....	15
4.1 กราฟแสดงปริมาณน้ำตาล (—) และปริมาณแคลเซียมมาเลต (- - -) เมื่อทำการเพาะเลี้ยง <i>Acetobacter</i> sp. BX2 ในอาหาร calcium malate production ที่มีน้ำตาลกลูโคส (x) น้ำตาลฟรุกโตส (□) และน้ำตาลซูโครส (Δ) เป็นแหล่งคาร์บอน ตามลำดับ.....	41
4.2 กราฟแสดงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือเมื่อทำการเพาะเลี้ยง <i>Acetobacter</i> sp. BX2 ในอาหาร calcium malate production โดยการใช้กาน้ำตาลอ้อยที่ไม่ปรับสภาพ (◇) ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริก (□) ปรับสภาพด้วยถ่านกัมมันต์ (Δ) ปรับสภาพด้วยแคลเซียมไฮดรอกไซด์ (x) ปรับสภาพด้วยโพแทสเซียมเพอร์โรไซยาไนด์ (✕) และกาน้ำตาลอ้อยปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกและแคลเซียมไฮดรอกไซด์ (○) เป็นแหล่งคาร์บอน.....	47

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.3 กราฟแสดงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือเมื่อทำการเพาะเลี้ยง <i>Acetobacter</i> sp. BX2 ในอาหาร calcium malate production ที่มีกากน้ำตาลอ้อยที่ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริก และแคลเซียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้น 50 (◇) 100 (□) 150 (Δ) และ 200 (×) กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เป็นแหล่งคาร์บอน.....	52
4.4 กราฟแสดงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือเมื่อทำการเพาะเลี้ยง <i>Acetobacter</i> sp. BX2 ในอาหาร calcium malate production ที่ใช้ corn steep liquor ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0 (◇) 0.25 (□) 0.5 (Δ) 0.75 (×) และ 1 (✱) โดยปริมาตร ตามลำดับ เป็นแหล่งไนโตรเจน	57
4.5 กราฟแสดงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ (○) ปริมาณแคลเซียมมาเลต (Δ) และอัตราการผลิตแคลเซียมมาเลต (✱) เมื่อทำการเพาะเลี้ยง <i>Acetobacter</i> sp. BX2 ในอาหาร calcium malate production ที่มีกากน้ำตาลอ้อยที่ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกและแคลเซียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้น 200 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และใช้ corn steep liquor ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.25 โดยปริมาตร เป็นแหล่งไนโตรเจน	61
ข.1 กราฟมาตรฐานสารละลายน้ำตาลกลูโคสสำหรับวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร และความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคส (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร).....	74
ข.2 กราฟมาตรฐานสารละลายน้ำตาลไซโลสสำหรับวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร และความเข้มข้นน้ำตาลไซโลส (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร).....	74
ข.3 กราฟมาตรฐานสารละลายน้ำตาลกลูโคสสำหรับวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร และความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคส(ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	76
ข.4 กราฟมาตรฐานสารละลายน้ำตาลไซโลสสำหรับวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร และความเข้มข้นน้ำตาลไซโลส (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร).....	76

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

(ต่อ)

รูปที่	หน้า
ค.1 กราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคสสำหรับวิเคราะห์ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสที่เป็นองค์ประกอบของกากน้ำตาลอ้อย แสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้กราฟและความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร).....	80
ค.2 กราฟมาตรฐานน้ำตาลฟรุกโตสสำหรับวิเคราะห์ความเข้มข้นของน้ำตาลฟรุกโตสที่เป็นองค์ประกอบของกากน้ำตาลอ้อย แสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้กราฟและความเข้มข้นของน้ำตาลฟรุกโตส (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร).....	82
ค.3 กราฟมาตรฐานน้ำตาลซูโครสสำหรับวิเคราะห์ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสที่เป็นองค์ประกอบของกากน้ำตาลอ้อย แสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้กราฟและความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร).....	84
จ.1 แสดงลักษณะตะกอนแคลเซียมมาเลตที่ได้จากการเพาะเลี้ยง <i>Acetobacter</i> sp. BX2 โดยการใช้น้ำตาลกลูโคส ฟรุกโตส และซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน (A) การใช้กากน้ำตาลอ้อยที่ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกและแคลเซียมไฮดรอกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอน (B) การใช้กากน้ำตาลอ้อยที่ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกและแคลเซียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้น 200 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน (C) การใช้ corn steep liquor ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.25 โดยปริมาตร เป็นแหล่งไนโตรเจน (D) และ การใช้กากน้ำตาลอ้อยที่ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกและแคลเซียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 200 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และมี corn steep liquor ความเข้มข้นร้อยละ 0.25 โดยปริมาตร เป็นแหล่งไนโตรเจน (E) ตามลำดับ.....	100

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ

กรดมาลิก (Malic acid) หรือเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า D-hydroxybutanedioic acid เป็นกรดไดคาร์บอกซิลิกที่มีสูตรเคมีคือ $C_4H_5O_6$ ซึ่งใช้กันอย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น อุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมสารเคมี อุตสาหกรรมสิ่งทอ อุตสาหกรรมกระดาษ การบำบัดน้ำเสีย และยังใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตพลาสติกที่ย่อยสลายได้ เป็นต้น (Liu และคณะ, 2015; Wang และคณะ, 2016; Khan และคณะ, 2014; Cheng และคณะ, 2017; Wei และคณะ, 2017) นอกจากนี้ แคลเซียมมาเลตซึ่งเป็นเกลือของกรดมาลิกยังถูกใช้ในอุตสาหกรรมยาอีกด้วย (Branson และคณะ, 2002)

ปัจจุบันการผลิตกรดมาลิกสามารถผลิตได้สองกระบวนการ คือกระบวนการทางเคมีและกระบวนการทางชีวภาพ โดยกระบวนการทางเคมีเกิดจากปฏิกิริยาไฮเดรชัน (hydration) กรดฟูมาริก หรือกรดมาเลอิกเพื่อเปลี่ยนมาเป็นกรดมาลิกภายใต้อุณหภูมิและความดันสูง (Bressler และคณะ, 2008; Kozo และคณะ, 1976; Isao และคณะ, 1980) แต่กระบวนการดังกล่าวมีข้อเสีย ได้แก่ ต้นทุนในการผลิตสูงและส่งผลให้เกิดปัญหาทางด้านสิ่งแวดล้อม จึงไม่เป็นที่นิยมเพื่อนำมาผลิตกรดมาลิกในปัจจุบัน (Goldberg และคณะ, 2006) สำหรับกระบวนการผลิตกรดมาลิกทางชีวภาพ ได้มีการศึกษาการผลิตกรดมาลิกโดยอาศัยการหมักของจุลินทรีย์ เนื่องจากจุลินทรีย์สามารถผลิตกรดมาลิกได้และเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม (Chi และคณะ, 2016) โดยในปัจจุบันพบจุลินทรีย์หลายชนิดที่สามารถผลิตกรดมาลิกได้ เช่น *Aspergillus* sp. (Battat และคณะ, 1991; West, 2011) *Zygosaccharomyces rouxii* (Taing และ Taing, 2007) *Schizophyllum commune* (Mikio และคณะ, 1997) *Saccharomyces cerevisiae* และ *Escherichia coli* เป็นต้น (Moon และคณะ, 2008; Zelle และคณะ, 2008; Zhang และคณะ, 2011) และจากรายงานก่อนหน้านี้ได้มีการศึกษาการใช้วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรหรือวัสดุเหลือทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมเป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อการผลิตกรดมาลิก เช่น การใช้ฟางข้าวสาลีที่ผ่านการย่อยสลายแล้วเป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยง *Aureobasidium pullulans* (Leathers และ Manitchotpisit, 2013) การใช้ขี้ข้าวโพดที่ผ่านการย่อยสลายแล้วเป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Aureobasidium pullulans* สายพันธุ์ YJ 6-11 (Zou และคณะ, 2016) การใช้กากน้ำตาลถั่วเหลืองเป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Aureobasidium pullulans* (Cheng และคณะ, 2017) และการใช้กากน้ำตาลอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Aureobasidium pullulans* (Wei และคณะ, 2017) เป็นต้น โดยเฉพาะกากน้ำตาลอ้อยซึ่งเป็นผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตน้ำตาลทราย และ

เนื่องจากอ้อยเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย โดยประเทศไทยสามารถผลิตอ้อยเป็นอันดับ 1 ของโลกได้มากที่สุด ซึ่งอ้อยที่เหลือจากการผลิตน้ำตาลทรายจะถูกนำไปใช้

4 ของโลกคิดเป็นร้อยละ 6 รองจากประเทศบราซิลร้อยละ 39 ประเทศอินเดียร้อยละ 19 และประเทศจีนร้อยละ 6 ตามลำดับ (Silertruksa และ Gheewala, 2018) ซึ่งกากน้ำตาลอ้อยเป็นของเหลือชนิดสีเข้ม (Zhang และคณะ, 2015; Xia และคณะ, 2016) ประกอบด้วยน้ำตาลซูโครสร้อยละ 30-40 ฟรุคโตสร้อยละ 5-12 กลูโคสร้อยละ 4-9 น้ำร้อยละ 17-25 เถ้าร้อยละ 7-15 และแร่ธาตุต่างๆ เช่น แมกนีเซียม แมงกานีส และสังกะสี เป็นต้น (Teclu และคณะ, 2019) แต่ปัญหาของกากน้ำตาลอ้อยที่พบคือมีความเข้มข้นของน้ำตาลสูงส่งผลให้เกิดแรงดันออสโมติกสูงและมีตะกอนไอออนโลหะหนักส่งผลให้ลดกระบวนการเมแทบอลิซึมของเซลล์ส่งผลให้ผลผลิตของผลิตภัณฑ์ลดลง (Cazetta และคณะ, 2007; Lafourcad และคณะ, 1979) จึงต้องทำการปรับสภาพกากน้ำตาลอ้อยโดยการย่อยน้ำตาลซูโครสให้กลายเป็นน้ำตาลกลูโคสและฟรุคโตสเพื่อให้จุลินทรีย์สามารถใช้น้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตกรดมาลิก (Tomatoni และ Vitolo, 2010) ดังนั้นโครงการพิเศษนี้จึงสนใจที่จะศึกษาวิธีการปรับสภาพกากน้ำตาลอ้อยและศึกษาการผลิตกรดมาลิกจาก *Acetobacter* sp. BX2 ซึ่งคัดแยกได้จากลำไยโดยประภัสสร และสุพรรณิกา (2557) ด้วยกระบวนการหมักโดยใช้กากน้ำตาลอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอน

1.2 วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาความสามารถในการใช้น้ำตาลชนิดต่างๆ ที่เป็นองค์ประกอบของกากน้ำตาลอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยง *Acetobacter* sp. BX2 เพื่อผลิตกรดมาลิก
2. เพื่อศึกษาผลของการใช้กากน้ำตาลอ้อยที่ไม่ปรับสภาพ และกากน้ำตาลอ้อยที่ปรับสภาพด้วยวิธีต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตกรดมาลิกโดย *Acetobacter* sp. BX2
3. เพื่อศึกษาผลของปริมาณแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตกรดมาลิกโดย *Acetobacter* sp. BX2
4. เพื่อศึกษาการผลิตและอัตราการผลิตกรดมาลิกโดย *Acetobacter* sp. BX2

1.3 ขอบเขตของโครงการพิเศษ

1. ทำการวิเคราะห์องค์ประกอบของกากน้ำตาลอ้อยด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography ; HPLC)
2. ทำการปรับสภาพกากน้ำตาลอ้อยด้วยกรดซัลฟูริก ปรับสภาพกากน้ำตาลอ้อยด้วยถ่านกัมมันต์ ปรับสภาพกากน้ำตาลอ้อยด้วยแคลเซียมไฮดรอกไซด์ ปรับสภาพกากน้ำตาลอ้อยด้วยโพแทสเซียมเพอร์โรซายานด์ (Xu และคณะ, 2015) และปรับสภาพกากน้ำตาลอ้อยด้วยกรดซัลฟูริกและแคลเซียมไฮดรอกไซด์ (Cheng และคณะ, 2017)
3. ศึกษาผลของการใช้น้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบในกากน้ำตาลอ้อย ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส ซูโครส และฟรุคโตสเป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยง *Acetobacter* sp. BX2 เพื่อผลิตกรดมาลิก

เอกสารนี้เป็นเอกสาร
 4. ศึกษาผลของการใช้กากน้ำตาลอ้อยที่ไม่ปรับสภาพและกากน้ำตาลอ้อยที่ปรับสภาพ
 ไม่ว่าการณีใดๆ ทั้งวิธี ได้แก่ การปรับสภาพกากน้ำตาลอ้อยด้วยกรดซัลฟูริก การปรับสภาพกากน้ำตาลอ้อย

ด้วยถ่านกัมมันต์ การปรับสภาพกากน้ำตาลอ้อยด้วยแคลเซียมไฮดรอกไซด์ การปรับสภาพกากน้ำตาลอ้อยด้วยโพแทสเซียมเพอร์โรซายาไนต์ และการปรับสภาพกากน้ำตาลอ้อยด้วยกรดซัลฟูริกและแคลเซียมไฮดรอกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยง *Acetobacter* sp. BX2 เพื่อผลิตกรดมาลิก

5. ศึกษาผลของการใช้กากน้ำตาลอ้อยที่ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกและแคลเซียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันเป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยง *Acetobacter* sp. BX2 เพื่อผลิตกรดมาลิก
6. ศึกษาผลของการใช้ corn steep liquor ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันเป็นแหล่งไนโตรเจนในการเพาะเลี้ยง *Acetobacter* sp. BX2 เพื่อการผลิตกรดมาลิก
7. ศึกษาอัตราการผลิตกรดมาลิก เมื่อทำการเพาะเลี้ยง *Acetobacter* sp. BX2 ด้วยอาหาร calcium malate production ที่มีกากน้ำตาลอ้อยที่ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกและแคลเซียมไฮดรอกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอน และมี corn steep liquor เป็นแหล่งไนโตรเจน
8. ทำการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธีดีเอ็นเอส (Dinitrosalicylic colorimetric method) (Miller, 1959)
9. ทำการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธีฟีนอลซัลฟูริก (Phenol sulfuric) (Dubosí และคณะ, 1956)
10. ทำการตกตะกอนแคลเซียมมาเลตด้วยเมทานอล (Wang และคณะ, 2013)
11. ทำการวิเคราะห์ปริมาณแคลเซียมมาเลตด้วยวิธีการไทเทรต (FAO, 2006)

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถลดต้นทุนในการผลิตกรดมาลิกโดยการใช้กากน้ำตาลอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอน
2. สามารถใช้เป็นแนวทางในการผลิตกรดมาลิกทางชีวภาพด้วยแบคทีเรียโดยการใช้กากน้ำตาลอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอน
3. เพื่อเพิ่มมูลค่าของกากน้ำตาลอ้อยซึ่งเป็นวัสดุเหลือทิ้งจากโรงงานผลิตน้ำตาลทราย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 *Acetobacter* sp.

Acetobacter sp. เซลล์มีลักษณะเป็นรูปแท่ง มีการจัดเรียงตัวเป็นคู่หรือเป็นโซ่ ดังรูปที่ 2.1 แกรมลบ ส่วนใหญ่สามารถเคลื่อนที่โดยแฟลเจลลาที่ยื่นออกมานอกเซลล์ โคโลนีโดยทั่วไปจะมีลักษณะเป็นวงกลม ผิวเรียบ สีครีมถึงสีเบจ และทึบแสง มีการหายใจแบบใช้อากาศ ให้ผลทดสอบ catalase เป็นบวก (ยกเว้น *A. peroxydans*) และผลทดสอบ oxidase เป็นลบ นอกจากนี้ *Acetobacter* sp. ยังสามารถทนต่อค่าพีเอชที่ต่ำและกรดที่มีความเข้มข้นสูง และยังสามารถใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตอาหารและเครื่องดื่ม เช่น น้ำส้มสายชู ชากัมพูชา โกโก้ รุ้นมะพร้าว และไวน์ เป็นต้น (Nuno และ Melo, 2016)



รูปที่ 2.1 แสดงลักษณะรูปร่างของ *Acetobacter* sp.

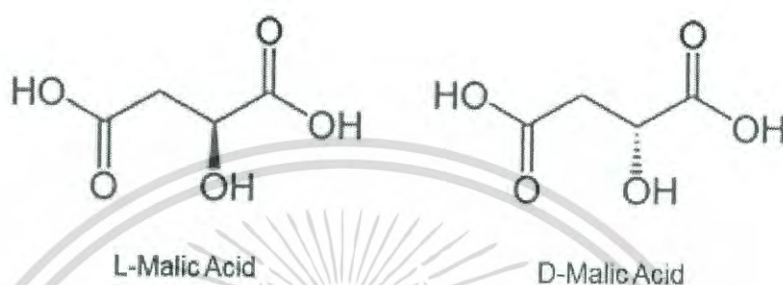
ที่มา : <https://pixels.com/featured/acetobacter-aceti-bacteria-scimat.html>

2.2 กรดมาลิก

กรดมาลิก (Malic acid) สามารถเรียกอีกชื่อหนึ่งได้ว่า 2-hydroxybutanedioic acid ซึ่งเป็นกรดไดคาร์บอกซิลิกที่มีคาร์บอนจำนวน 4 อะตอม กรดมาลิกมีโครงสร้าง 2 แบบ คือ แบบ L และ D form ดังรูปที่ 2.2 โดยสามารถพบกรดมาลิกแบบ L form ได้ในธรรมชาติ สามารถพบได้ในผลไม้ที่มีรสเปรี้ยว เช่น แอปเปิ้ล และมะเขือเทศ เป็นต้น (Peleg และคณะ, 1988) ในปี 2004 กระทรวงพลังงานของสหรัฐอเมริกา ได้ยอมรับให้กลุ่มของ 1,4-dicarboxylic acid ที่ประกอบไปด้วยกรดซักซินิก กรดฟูมาริก และกรดมาลิก เป็น 1 ใน 12 สารเคมีที่น่าสนใจที่สามารถผลิตได้จากชีวมวล (Zelle และคณะ, 2008) กรดมาลิกถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรม

ยา อุตสาหกรรมสิ่งทอ และการบำบัดน้ำเสียจึงทำให้กรดมาลิกได้รับความนิยมและผลิตรวมถึง 140,000 ตันต่อปี (Brown และคณะ, 2013) ในการสังเคราะห์กรดมาลิกสามารถผลิตได้ทั้งจากไม่วากรรมใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งยังมีเทคโนโลยีการแปรรูปและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กระบวนการทางเคมีและชีวภาพ โดยกระบวนการทางเคมีสามารถสังเคราะห์ได้จากปิโตรเคมีหรือจากวิธีการไฮเดรชันของกรดมาเลอิกและกรดฟูมาริก อย่างไรก็ตามราคาของปิโตรเคมีที่เพิ่มขึ้นและการลดลงของแหล่งน้ำมัน ได้สร้างความสนใจในการผลิตกรดมาลิกจากชีวมวล โดยวิธีต่างๆ เช่น การตรึงเซลล์ การตรึงเอนไซม์ที่แยกได้ และการหมักจุลินทรีย์โดยตรงโดยการใช้น้ำตาลหรือไม่ใช้น้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน (Cheng และคณะ, 2017; Iyyappan และคณะ, 2018) ทำให้วิธีการสังเคราะห์กรดมาลิกด้วยวิธีทางชีวภาพเป็นวิธีการที่ได้รับความนิยมในปัจจุบัน

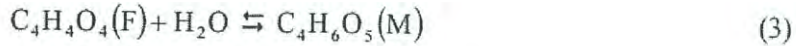
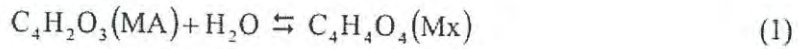


รูปที่ 2.2 แสดงโครงสร้างแบบ L และ D form ของกรดมาลิก
ที่มา : Aydogan และคณะ (2015)

2.3 การสังเคราะห์กรดมาลิกด้วยกระบวนการทางเคมี

กรดมาลิกเป็นผลิตภัณฑ์ที่ผลิตได้จากการเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพและทางเคมีของกรดฟูมาริก และมาเลอิกแอนไฮไดรด์ อย่างไรก็ตามการสังเคราะห์กรดมาลิกโดยวิธีทางชีวภาพสามารถผลิตกรดมาลิกได้ช้ากว่าการสังเคราะห์กรดมาลิกด้วยวิธีทางเคมี และมีเพียงร้อยละ 15 ของกรดมาลิกในตลาดโลกเท่านั้นที่ทำการสังเคราะห์มาจากกระบวนการทางชีวภาพ ซึ่งการสังเคราะห์กรดมาลิกด้วยวิธีการทางเคมีประกอบด้วย 3 ปฏิกิริยา (Ortiz และคณะ, 2017) ดังรูปที่ 2.3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.3 แสดงปฏิกิริยาการสังเคราะห์กรดมาลิกด้วยกระบวนการเคมี
 หมายเหตุ (MA) คือ มาเลอิกแอนไฮไดรด์ (maleic anhydride) (Mx) คือ กรดมาเลอิก
 (maleic acid) (F) คือ กรดฟูมาริก (fumaric acid) และ (M) คือ กรดมาลิก (malic acid)

ที่มา : Ortiz และคณะ (2017)

ปฏิกิริยาที่ 1 เป็นปฏิกิริยาการเติมน้ำ 1 โมเลกุลให้แก่มาเลอิกแอนไฮไดรด์ (maleic anhydride) เกิดเป็นกรดมาเลอิก (maleic acid)

ปฏิกิริยาที่ 2 เป็นปฏิกิริยาการเปลี่ยนโครงสร้าง (isomerization) จากกรดมาเลอิกเป็นกรดฟูมาริก (fumaric acid) โดยมีกรดไฮโดรคลอริก เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

ปฏิกิริยาที่ 3 เป็นปฏิกิริยาการเติมน้ำ 1 โมเลกุลให้แก่กรดฟูมาริกเกิดเป็นกรดมาลิก (malic acid) โดยมีกรดไฮโดรคลอริก เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

โดยปฏิกิริยาจะเกิดที่อุณหภูมิสูงกว่า 423 เคลวิน ความดัน 1,400 กิโลปาสกาล เป็นเวลาประมาณ 3-5 ชั่วโมง ผลิตภัณฑ์ที่ได้ประกอบด้วย กรดมาลิกร้อยละ 40-60 กรดฟูมาริกร้อยละ 40-60 และกรดมาเลอิก ร้อยละ 2-3 หลังจากได้ผลิตภัณฑ์แล้วจะเข้าสู่ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ โดยการตกตะกอนและการกรองกรดฟูมาริกที่อุณหภูมิต่ำ (กรดฟูมาริกละลายในน้ำได้ไม่ดี) และการตกผลึกกรดมาลิก (DL-malic acid) หลังจากการตกผลึกกรดมาลิกที่ได้จะมีลักษณะเป็นผงสีขาวโดยจะมีปริมาณของกรดฟูมาริกและกรดมาเลอิกที่ปนเปื้อนอยู่น้อยกว่าร้อยละ 1 และ 0.005 ตามลำดับ (Ortiz และคณะ, 2017)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 การสังเคราะห์กรดมาลิกด้วยกระบวนการทางชีวภาพ

2.4.1 วิถีเมแทบอลิซึมที่เกี่ยวข้องกับการผลิตกรดมาลิก

ในการผลิตกรดมาลิกด้วยกระบวนการทางชีวภาพโดยการใช้จุลินทรีย์ สามารถผลิตกรดมาลิกได้จากวิถีเมแทบอลิซึมต่างๆ ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ของจุลินทรีย์ เมื่อใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน น้ำตาลกลูโคสจะถูกลดผ่านวิถีไกลโคไลซิส (glycolysis pathway) ได้เป็นไพรูเวท จากนั้นไพรูเวทจะเข้าสู่วิถีเมแทบอลิซึมการผลิตกรดมาลิก ส่วนการใช้น้ำตาลไซโลสหรือน้ำตาลคาร์บอน 5 อะตอมเป็นแหล่งคาร์บอน จะต้องเข้าสู่วิถีเพนโตสฟอสเฟต (pentose phosphate pathway) ก่อนเพื่อเปลี่ยนน้ำตาลคาร์บอน 5 อะตอมเป็นฟรุกโตส-6-ฟอสเฟต และกลีเซอรอลดีไฮด์-3-ฟอสเฟต แล้วเข้าสู่วิถีไกลโคไลซิสและวิถีเมแทบอลิซึมการผลิตกรดมาลิก ตามลำดับ

2.4.1.1 วิถีไกลโคไลซิส (Glycolysis pathway)

วิถีไกลโคไลซิส (glycolysis pathway) หรือเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า Embden-Meyerhof-Parnas pathway (EMP) เป็นกระบวนการสลายน้ำตาลกลูโคสซึ่งมีคาร์บอน 6 อะตอมไปเป็นกรดไพรูเวทซึ่งมีคาร์บอน 3 อะตอม จำนวน 2 โมเลกุล โดยเกิดที่ไซโทพลาสซึมของเซลล์ที่เรียกว่าไซโทซอล (cytosol) มี 10 ขั้นตอน ดังนี้ (รูปที่ 2.4)

ขั้นตอนที่ 1 เริ่มต้นจากการเติมหมู่ฟอสเฟตที่ได้จาก ATP ให้กับน้ำตาลกลูโคส (glucose) เป็นน้ำตาลกลูโคส-6-ฟอสเฟต (glucose-6-phosphate) โดยเอนไซม์เฮกโซไคเนส (hexokinase) หรือกลูโคไคเนส (glucokinase)

ขั้นตอนที่ 2 เอนไซม์ฟอสโฟกลูโคสไอโซเมอเรส (phosphoglucose isomerase) เปลี่ยนไอโซเมอร์ของน้ำตาลกลูโคส-6-ฟอสเฟตซึ่งเป็นน้ำตาลอัลโดสให้เป็นน้ำตาลฟรุกโตส-6-ฟอสเฟต (fructose-6-phosphate) ซึ่งเป็นน้ำตาลคีโตส

ขั้นตอนที่ 3 เป็นการเติมหมู่ฟอสเฟตที่ได้จาก ATP ให้กับน้ำตาลฟรุกโตส-6-ฟอสเฟต ได้เป็นน้ำตาลฟรุกโตส-1,6-บิสฟอสเฟต (fructose-1,6-bisphosphate) แล ADP โดยเอนไซม์ฟอสโฟฟรุกโตไคเนส (phosphofruktokinase)

ขั้นตอนที่ 4 เป็นการสลายน้ำตาลฟรุกโตส-1,6-บิสฟอสเฟตที่เป็นน้ำตาลที่มีคาร์บอน 6 อะตอม จำนวน 1 โมเลกุล ให้เป็นน้ำตาลที่มีคาร์บอน 3 อะตอม จำนวน 2 โมเลกุล โดยประกอบด้วยน้ำตาลอัลโดส 1 โมเลกุล คือ กลีเซอรอลดีไฮด์-3-ฟอสเฟต (Glyceraldehyde-3-phosphate) และน้ำตาลคีโตส 1 โมเลกุล คือ ไดไฮดรอกซีอะซิโตนฟอสเฟต (dihydroxy acetonephosphate) ด้วยเอนไซม์ฟรุกโตส-1,6-บิสฟอสเฟตอัลโดเลส (fructose-1,6-bisphosphate aldolase)

ขั้นตอนที่ 5 กลีเซอรอลดีไฮด์-3-ฟอสเฟตเท่านั้นที่สามารถสลายต่อไปได้โดยวิถีไกล-

โคไลซิส ดังนั้นไดไฮดรอกซีอะซิโตนฟอสเฟตจะถูกเปลี่ยนเป็นกลีเซอรอลดีไฮด์-3-ฟอสเฟต เพื่อเข้าสู่วิถีไกลโคไลซิสเช่นกัน โดยเอนไซม์ไตรออสฟอสเฟตไอโซเมอเรส (triose phosphate isomerase)

ไม่จำกัดใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งยังมีเหตุผลและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เปลี่ยนไอโซเมอร์ของน้ำตาลคาร์บอน 3 อะตอม ชนิดคีโตสที่มีหมู่ฟอสเฟตให้เป็นน้ำตาลคาร์บอน 3 อะตอมชนิดอัลโดสที่มีหมู่ฟอสเฟต

ขั้นตอนที่ 6 เปลี่ยนกลีเซอรอลดีไฮด์-3-ฟอสเฟตเป็น 1,3-บิสฟอสโฟกลีเซอเรท (1,3-bisphosphoglycerate) โดยเอนไซม์กลีเซอรอลดีไฮด์-3-ฟอสเฟตดีไฮโดรจีเนส (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) โดยใช้ NAD^+ เป็นโคแฟกเตอร์ และได้ NADH 1 โมเลกุล

ขั้นตอนที่ 7 1,3-บิสฟอสโฟกลีเซอเรทให้หมู่ฟอสเฟตกับ ADP เกิดเป็น ATP แล้วจะได้ 3-ฟอสโฟกลีเซอเรท (3-phosphoglycerate) โดยมีเอนไซม์ฟอสโฟกลีเซอเรทไคเนส (phosphoglyceratekinase) ซึ่งมี Mg^{2+} เป็นโคแฟกเตอร์

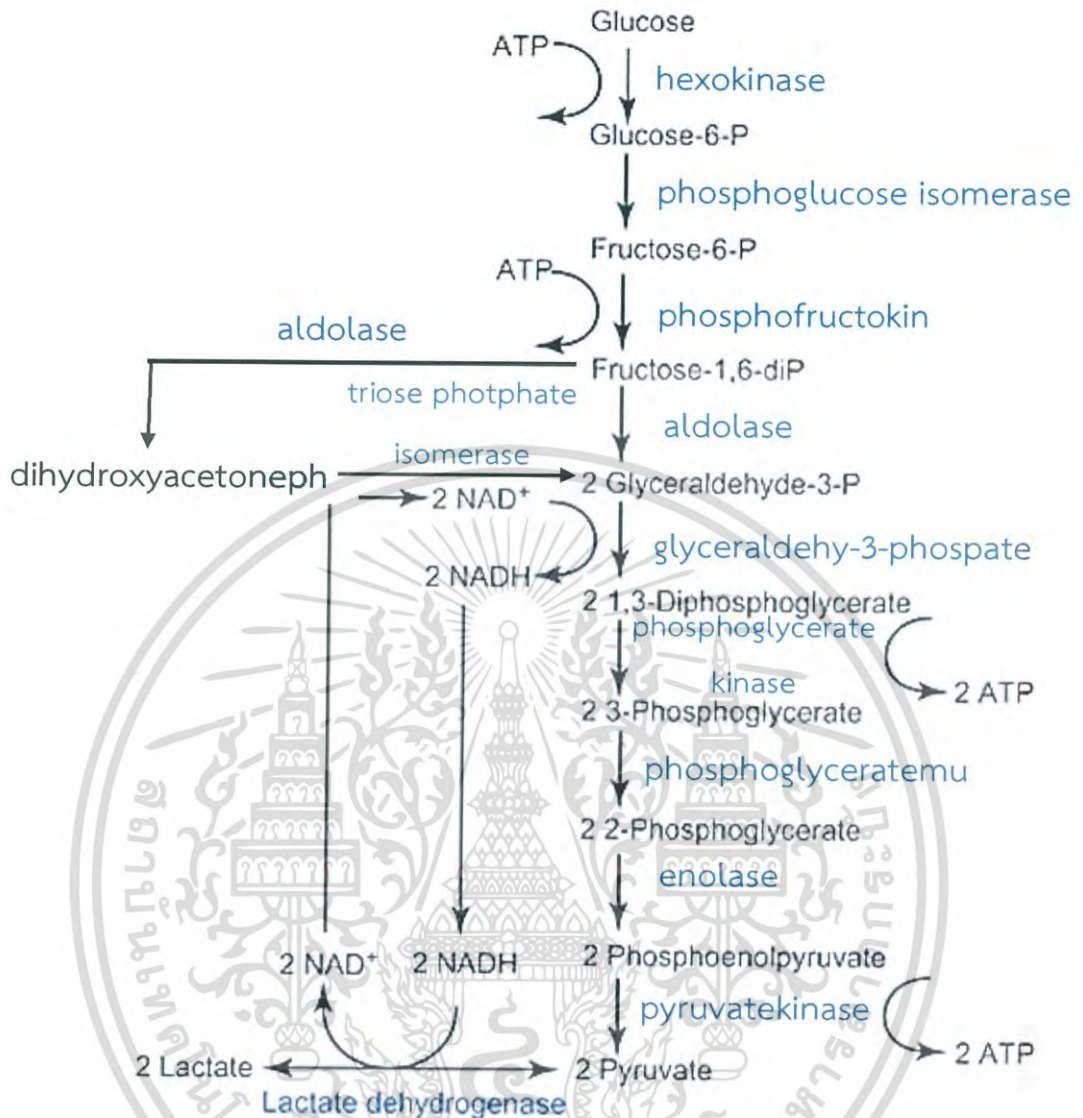
ขั้นตอนที่ 8 เป็นการย้ายตำแหน่งหมู่ฟอสเฟต ซึ่งเดิมอยู่ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 มาอยู่ในตำแหน่งที่ 2 โดยเอนไซม์ฟอสโฟกลีเซอเรทมิวเทส (phosphoglycerate mutase) เปลี่ยน 3-ฟอสโฟกลีเซอเรท เป็น 2-ฟอสโฟกลีเซอเรท (2-phosphoglycerate)

ขั้นตอนที่ 9 เป็นขั้นตอนการกำจัดน้ำออกจาก 2-ฟอสโฟกลีเซอเรท ได้เป็นฟอสโฟอินอลไพรูเวท (phosphoenolpyruvate) โดยเอนไซม์อินเลส (enolase) ซึ่งมี Mg^{2+} เป็นโคแฟกเตอร์

ขั้นตอนที่ 10 ฟอสโฟอินอลไพรูเวทให้หมู่ฟอสเฟตกับ ADP เกิดเป็น ATP แล้วได้ไพรูเวท (pyruvate) โดยเอนไซม์ไพรูเวทไคเนส (pyruvatekinase)

ดังนั้นน้ำตาลกลูโคส 1 โมเลกุล ที่เข้าสู่วิถีไกลโคไลซิส เมื่อสลายแล้วได้ไพรูเวท 2 โมเลกุล และได้ ATP 2 โมเลกุล และ NADH 2 โมเลกุล (Chaudhry และ Varacallo, 2018)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.4 วิธีไกลโคไลซิส (glycolysis pathway)

ที่มา: ดัดแปลงจาก Feher (2017)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.1.2 วิถีเพนโตสฟอสเฟต (Pentose phosphate pathway)

วิถีเพนโตสฟอสเฟต (pentose phosphate pathway) หรือเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า วิถีฟอสโฟกลูโคเนต (phosphogluconate pathway) หรือเฮกโซสมอนฟอสเฟตซันด์ (hexose monophosphate shunt) มีทั้งหมด 9 ขั้นตอน ดังรูปที่ 2.5

ขั้นตอนที่ 1 เริ่มต้นจากการเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคส (glucose) เป็นน้ำตาลกลูโคส-6-ฟอสเฟต (glucose-6-phosphate) โดยเอนไซม์เฮกโซไคเนส (hexokinase)

ขั้นตอนที่ 2 เอนไซม์กลูโคส-6-ฟอสเฟตดีไฮโดรจีเนส (glucose-6-phosphate dehydrogenase; G6PDH) จะทำปฏิกิริยาออกซิเดชันกับน้ำตาลกลูโคส-6-ฟอสเฟต ให้อยู่ในรูป 6-ฟอสโฟกลูโคโนแลกโตน (6-phosphogluconolactone) ในขณะที่เปลี่ยน NADP^+ เป็น NADPH

ขั้นตอนที่ 3 เอนไซม์ 6-ฟอสโฟกลูโคเนส (6-phosphogluconase; 6PGL) จะทำให้เกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (Hydrolysis) ของ 6-ฟอสโฟกลูโคโนแลกโตน เกิดเป็น 6-ฟอสโฟกลูโคเนต (6-phosphogluconate)

ขั้นตอนที่ 4 เอนไซม์ 6-กลูโคสฟอสเฟตดีไฮโดรจีเนส (6-phosphogluconate dehydrogenase; 6PGDH) ทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดทีฟดีคาร์บอกซิเลชัน (oxidative decarboxylation) ของ 6-ฟอสโฟกลูโคเนตเกิดเป็นไรบูโลส-5-ฟอสเฟต (ribulose 5-phosphate) ในขั้นตอนนี้จะมีการสร้าง NADPH ขึ้น

ขั้นตอนที่ 5 และ 6 ไรบูโลส-5-ฟอสเฟต จะเกิดปฏิกิริยาไอโซเมอไรเซชัน (isomerization) โดยเอนไซม์ไรโบส-5-ฟอสเฟตไอโซเมอเรส (ribose-5-phosphate isomerase; RPI) สร้างเป็นไรโบส-5-ฟอสเฟต (ribose-5-phosphate) ในขณะเดียวกันไรบูโลส-5-ฟอสเฟต จะเกิดปฏิกิริยาการกำจัดของ epulerose โดยเอนไซม์ไรบูโลส-5-ฟอสเฟต-3-อีพิเมอเรส (ribulose 5-phosphate-3-epimerase; RPE) เพื่อสร้างเป็นไซลูโลส-5-ฟอสเฟต (xylulose-5-phosphate) ตามลำดับ

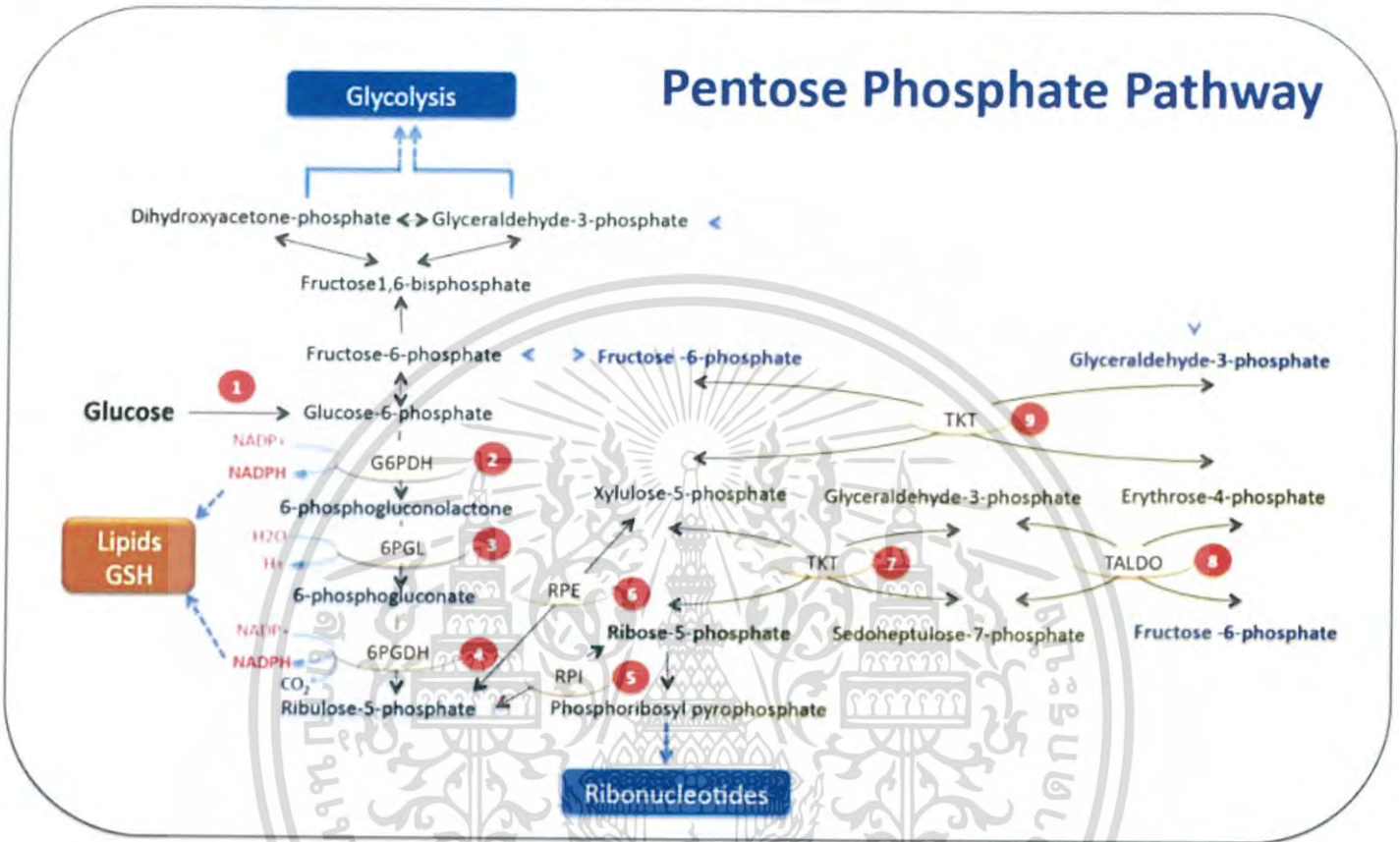
ขั้นตอนที่ 7 เอนไซม์ทรานส์คีโตเลส (transketolase; TKT) จะถ่ายโอนหน่วยคาร์บอน 2 หน่วยจากไซลูโลส-5-ฟอสเฟต ไปยังไรโบส-5-ฟอสเฟต เพื่อสร้างเป็นซีโดเฮปทุโลส-7-ฟอสเฟต (sedoheptulose-7-phosphate) และกลีเซอรอลดีไฮด์-3-ฟอสเฟต (glyceraldehyde-3-phosphate)

ขั้นตอนที่ 8 เอนไซม์ทรานส์แอลโดเลส (transaldolase; TALDO) จะถ่ายโอนหน่วยคาร์บอน 3 หน่วยจากซีโดเฮปทุโลส-7-ฟอสเฟต ไปยังกลีเซอรอลดีไฮด์-3-ฟอสเฟต เพื่อสร้างเป็นอีริโทส-4-ฟอสเฟต (erythrose-4-phosphate) และฟรุกโตส-6-ฟอสเฟต (fructose-6-phosphate)

ขั้นตอนที่ 9 เกิดปฏิกิริยาที่ใช้เอนไซม์ทรานส์คีโตเลส ครั้งที่ 2 ถ่ายโอนคาร์บอน 2 หน่วยจากไซลูโลส-5-ฟอสเฟต และอีริโทส-4-ฟอสเฟต เพื่อสร้างเป็นฟรุกโตส-6-ฟอสเฟต และกลีเซอรอลดีไฮด์-3-ฟอสเฟต โดย ฟรุกโตส-6-ฟอสเฟต สามารถใช้สำหรับวิถีไกลโคไลซิส หรือถูก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาด้านนี้ เมื่อนักผู้จัดทำเห็นว่าไม่เหมาะสมกับการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เปลี่ยนกลับเป็นกลูโคส-6-ฟอสเฟต ในขณะที่กลีเซอรอลดีไฮด์-3-ฟอสเฟต สามารถใช้ในวิถีไกลโคไลซิสได้ (Patra และ Hay, 2014)



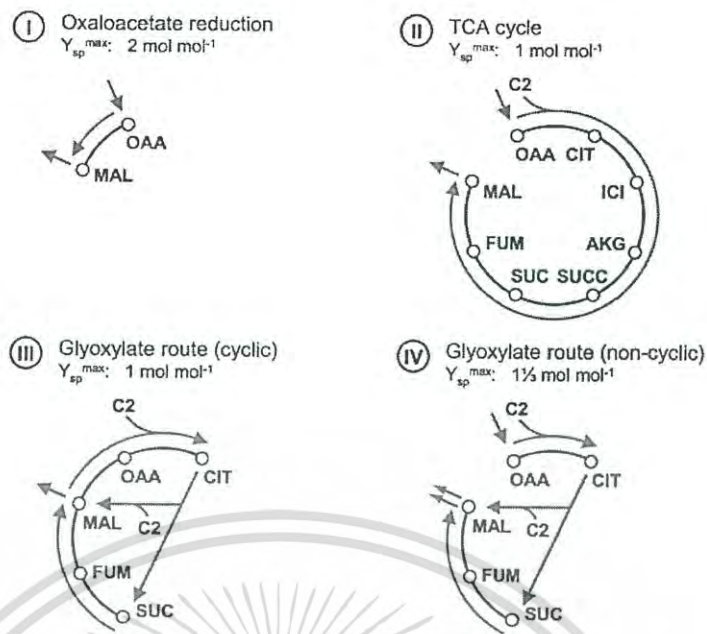
รูปที่ 2.5 วิถีเพนโทสฟอสเฟต (Pentose phosphate pathway)

ที่มา : Patra และ Hay (2014)

2.4.2 วิถีเมแทบอลิซึมการผลิตกรดมาลิก

โดยวิถีเมแทบอลิซึมที่ใช้ในการผลิตกรดมาลิกมีอยู่ 4 วิธี คือ Direct reduction of oxaloacetate วิถีจักรกรดไตรคาร์บอกซิลิก (Tricarboxylic acid, TCA cycle) วิถีจักรไกลออกซีเลต (Glyoxylate cycle) และวิถีจักรไกลออกซีเลตแบบไม่เต็มวง (Noncyclic glyoxylate) (Zelle และคณะ, 2008) ดังรูปที่ 2.6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.6 (I) Direct reduction of oxaloacetate (II) วงจรวัฏจักรกรดไตรคาร์บอกซิลิก (Tricarboxylic acid, TCA cycle) (III) วงจรวัฏจักรไกลออกซีเลต (Glyoxylate cycle) (IV) วงจรวัฏจักรไกลออกซีเลตแบบไม่เต็มวง (Noncyclic glyoxylate)
 หมายเหตุ : AKG คือ แอลฟาคีโตกลูตาเรต (α -ketoglutarate) CIT คือ ซิเตรต (citrate) FUM คือ ฟูมาเรต (fumarate) ICI คือ ไอโซซิเตรต (isocitrate) Mal คือ มาเลต (malate) OAA คือ ออกซาโลอะซิเตต (oxaloacetate) SUC คือ ซัคซิเนต (succinate) SUCC คือ ซัคซินิลโคเอ (succinyl-CoA)
 Y_{sp}^{max} คือ ผลผลิตสูงสุดตามทฤษฎี (โมลมาเลตต่อโมลกลูโคส)
 ที่มา : Zelle และคณะ (2008)

2.4.2.1 Direct reduction of oxaloacetate

ขั้นตอนแรก ไพรูเวท (pyruvate) รวมตัวกับคาร์บอนไดออกไซด์ ด้วยปฏิกิริยาคาร์บอกซิเลชัน เกิดเป็นออกซาโลอะซิเตต (oxaloacetate) โดยอาศัยเอนไซม์ไพรูเวทคาร์บอกซิเลส (pyruvate carboxylase) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา จากนั้นออกซาโลอะซิเตต (oxaloacetate) จะถูกเปลี่ยนเป็นมาเลต (malate) โดยอาศัยเอนไซม์มาเลตดีไฮโดรจีเนสไอโซเอนไซม์ (malate dehydrogenase isoenzymes) (Zelle และคณะ, 2008)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.2.2 วัฏจักรกรดไตรคาร์บอกซิลิก (Tricarboxylic acid, TCA cycle)

วัฏจักรกรดไตรคาร์บอกซิลิก เรียกอีกชื่อหนึ่งว่าวัฏจักรกรดซิตริก หรือวัฏจักรเครปส์ มีทั้งหมด 8 ขั้นตอน โดยจะเกิดขึ้นภายในไมโทคอนเดรีย ดังรูปที่ 2.7

ขั้นตอนที่ 1 ออกซาโลอะซิเตต (oxaloacetate) รวมตัวกับอะซิติลโคเอ (acetyl CoA) และน้ำ ด้วยปฏิกิริยาอัลโดคอนเดนเซชัน (aldol condensation) เป็นซิเตรต (citrate) โดยอาศัยเอนไซม์ซิเตรตซินเทส (citrate synthase) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

ขั้นตอนที่ 2 เอนไซม์อะโคนิเทส (aconitase) เร่งปฏิกิริยาไอโซเมอร์ไรเซชัน (isomerisation) โดยการดึงน้ำออกจากซิเตรต 1 โมเลกุลเกิดเป็นซิสอะโคนิเตต (cis-aconitate) จากนั้นเติมน้ำ 1 โมเลกุล ให้แก่ ซิสอะโคนิเตตที่เป็นพันธะคู่ของอินเตอร์มีเดียท ด้วยเอนไซม์อะโคนิเทส (aconitase) เกิดเป็นไอโซซิเตรต (isocitrate)

ขั้นตอนที่ 3 ไอโซซิเตรตเปลี่ยนเป็นแอลฟา-คีโตกลูตาเรต (α -ketoglutarate) โดยปฏิกิริยาดีคาร์บอกซิเลชัน (decarboxylation) โดยอาศัยเอนไซม์ไอโซซิเตรตดีไฮโดรจีเนส (isocitrate dehydrogenase) จะได้ คาร์บอนไดออกไซด์ 1 โมเลกุล และสร้าง $\text{NADH} + \text{H}^+$ จาก NAD^+ 1 โมเลกุล

ขั้นตอนที่ 4 แอลฟา-คีโตกลูตาเรตถูกออกซิไดซ์โดยจะมีการปล่อย คาร์บอนไดออกไซด์และมีการเติมโคเอนไซม์เอ (CoA-SH) เข้าไปแทนตำแหน่งคาร์บอนไดออกไซด์ได้เป็นซัคซินิลโคเอ (succinyl-Co A) โดยอาศัยเอนไซม์แอลฟา-คีโตกลูตาเรตดีไฮโดรจีเนส (α -ketoglutarate dehydrogenase) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา โดยมี NAD^+ มารับอิเล็กตรอนกลายเป็น $\text{NADH} + \text{H}^+$

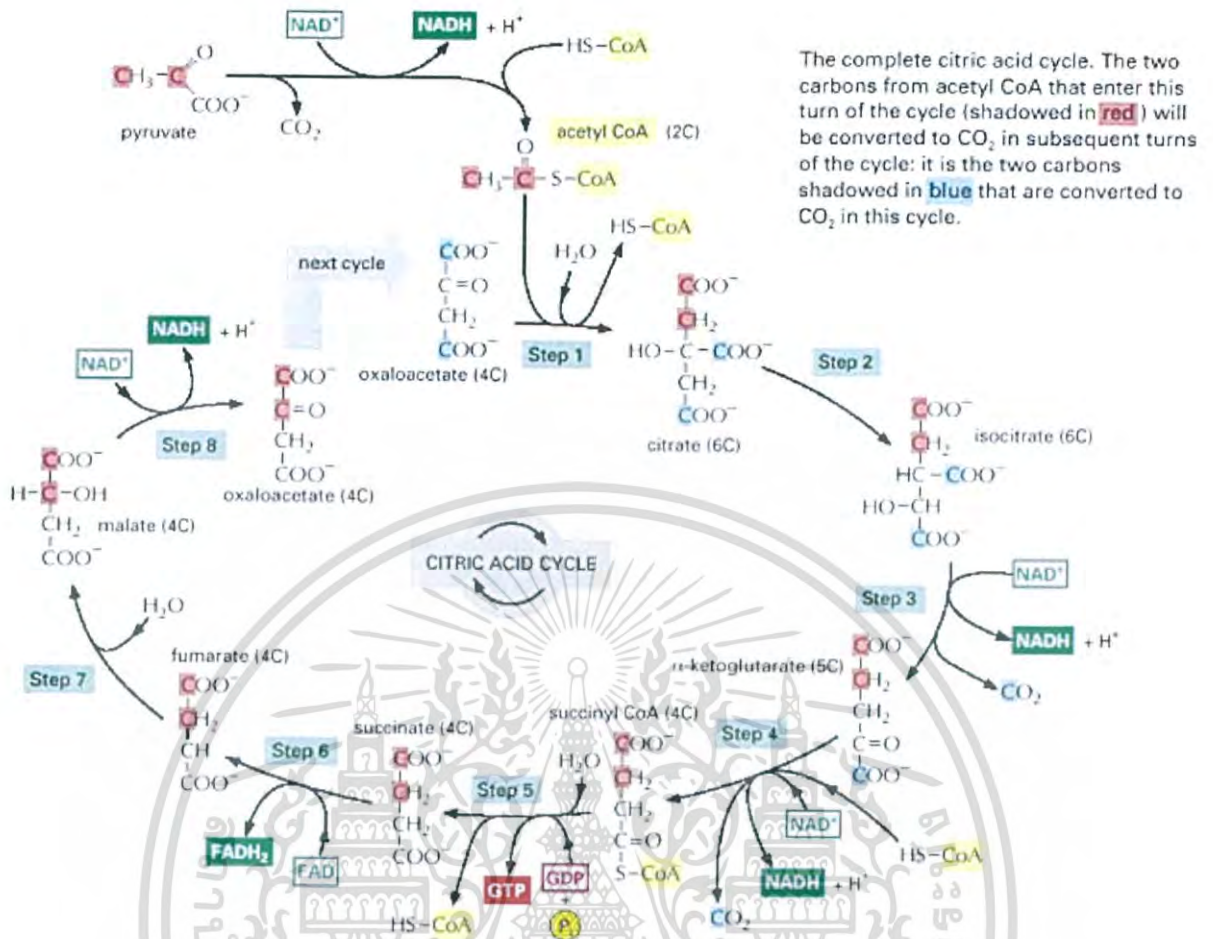
ขั้นตอนที่ 5 หมู่โคเอของซัคซินิลโคเอจะจับกับหมู่ฟอสเฟต และเปลี่ยนเป็นซัคซิเนต (succinate) โดยอาศัยเอนไซม์ซัคซินิลโคเอซินเทส (succinyl-Co A synthetase) มาเร่งปฏิกิริยา โดยในขั้นตอนนี้เป็นขั้นตอนที่ได้พลังงานออกมา โดยพลังงานที่ได้จะถูกเก็บไว้ในโมเลกุลของ GTP แล้วถ่ายทอดพลังงานให้กับ ATP

ขั้นตอนที่ 6 เอนไซม์ซัคซิเนตดีไฮโดรจีเนส (succinate dehydrogenase) จะทำปฏิกิริยากับซัคซิเนตเปลี่ยนไปเป็นฟูมาเรต (fumarate) ปฏิกิริยานี้จะสูญเสียอิเล็กตรอนแก่ FAD เกิดเป็น FADH_2

ขั้นตอนที่ 7 มีการเติมน้ำ 1 โมเลกุลแก่ฟูมาเรตเปลี่ยนเป็นมาเลต (malate) โดยอาศัยเอนไซม์ฟูมาเรส (fumarase) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

ขั้นตอนที่ 8 มาเลตจะถูกออกซิไดซ์ให้เป็นออกซาโลอะซิเตต (oxaloacetate) ซึ่งเป็นสารตั้งต้นที่จะไปรวมกับอะซิติลโคเอตัวใหม่ เพื่อเข้ารอบใหม่ของวัฏจักรกรดไตรคาร์บอกซิลิกต่อไป และมีการออกซิเดชัน NAD^+ จะถูกรีดิวซ์ให้เป็น $\text{NADH} + \text{H}^+$ ปฏิกิริยานี้จะมีเอนไซม์มาเลตดีไฮโดรจีเนส (malate dehydrogenase) มาช่วยเร่งปฏิกิริยา (Alberts และคณะ, 2002)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับกรใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.7 วัฏจักรกรดไตรคาร์บอกซิลิก (Tricarboxylic acid, TCA cycle)

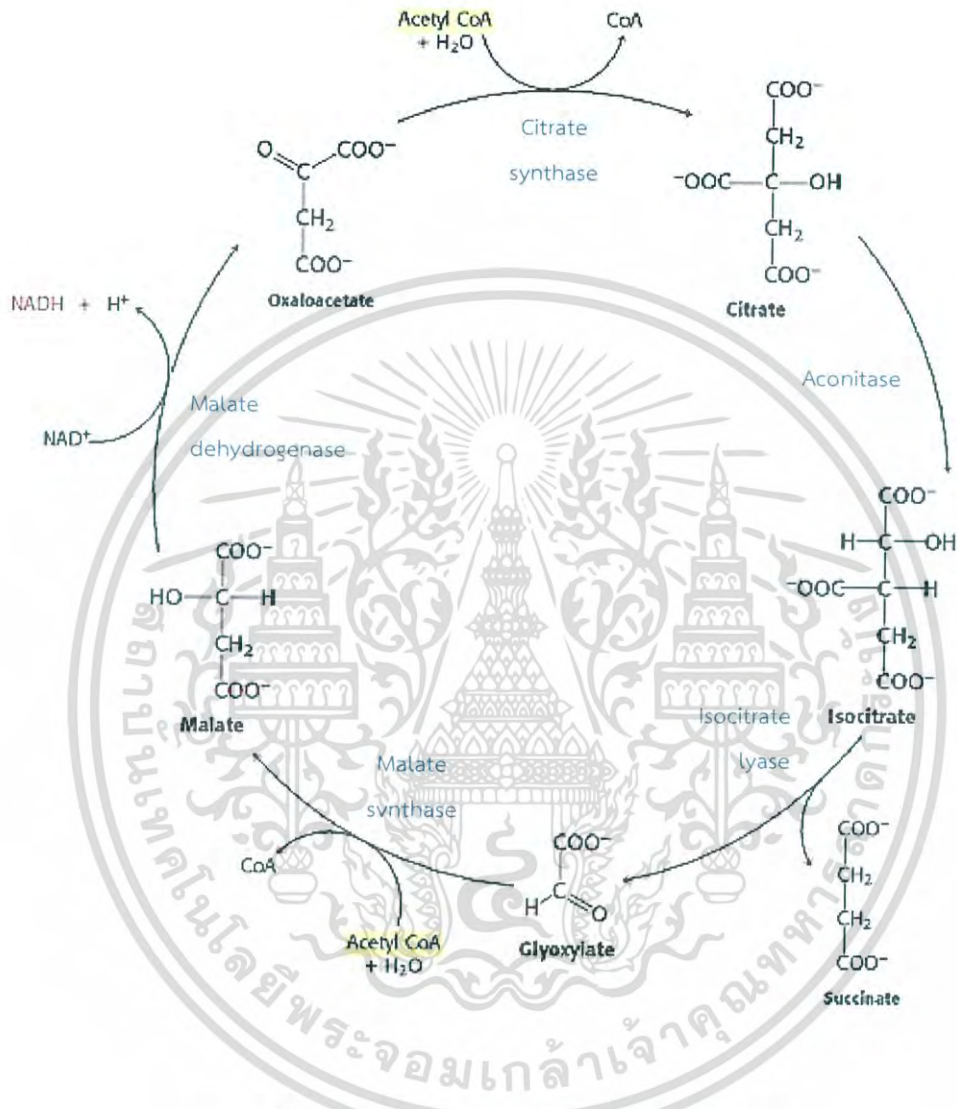
ที่มา : Alberts และคณะ (2002)

2.4.2.3 วัฏจักรไกลออกซีเลต (Glyoxylate cycle)

ในวัฏจักรไกลออกซีเลต (glyoxylate) อะซีติลโคเอ (acetyl-CoA) เกิดปฏิกิริยาควบแน่น (condensation) กับออกซาโลอะซิเตต (oxaloacetate) เพื่อสร้างเป็นซิเตรต (citrate) โดยอาศัยเอนไซม์ซิเตรตซินเทส (citrate synthase) และซิเตรตจะถูกเปลี่ยนเป็นไอโซซิเตรต (isocitrate) ด้วยเอนไซม์อะโคนิเทส (aconitase) เช่นเดียวกับในวัฏจักรกรดไตรคาร์บอกซิลิก ขั้นตอนต่อไปจะไม่ใช่การสลายตัวของไอโซซิเตรตโดยเอนไซม์ไอโซซิเตรตดีไฮโดรจีเนส (isocitrate dehydrogenase) แต่เป็นการเปลี่ยนไอโซซิเตรตเป็นไกลออกซีเลตโดยอาศัยเอนไซม์ไอโซซิเตรตไลเอส (isocitrate lyase) จากนั้นไกลออกซีเลตจะเกิดปฏิกิริยาควบแน่น กับอะซีติลโคเอโมเลกุลที่สองเกิดเป็นมาเลต (malate) โดยอาศัยเอนไซม์มาเลตซินเทส (malate synthase) เป็นตัวเร่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปฏิกิริยา จากนั้นมีการเปลี่ยนมาเลตเป็นออกซาโลอะซิเตต (Oxaloacetate) โดยเอนไซม์ มาเลตดีไฮโดรจีเนส (malate dehydrogenase) (Berg และคณะ, 2002) ดังรูปที่ 2.8



รูปที่ 2.8 วัฏจักรไกลออกซีเลต (Glyoxylate cycle)
ที่มา : Berg และคณะ (2002)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.2.4 วัฏจักรไกลออกซีเลตแบบไม่เต็มวง (Noncyclic glyoxylate)

วัฏจักรไกลออกซีเลตแบบไม่เต็มวงจะเกิดกระบวนการคล้ายกับที่เกิดในวัฏจักรไกลออกซีเลต (glyoxylate) โดยอะซิติลโคเอ (acetyl-CoA) เกิดปฏิกิริยาcondensation กับออกซาโลอะซิเตต (oxaloacetate) เพื่อสร้างเป็นซิเตรต (citrate) โดยอาศัยเอนไซม์ซิเตรตซินเทส และซิเตรตจะถูกเปลี่ยนเป็น ไอโซซิเตรต (isocitrate) ด้วยเอนไซม์อะโคนิเทส (aconitase) จากนั้นเปลี่ยนไอโซซิเตรตเป็นไกลออกซีเลตโดยอาศัยเอนไซม์ไอโซซิเตรตไลเอส (isocitrate lyase) จากนั้นไกลออกซีเลตจะเกิดปฏิกิริยาcondensationกับอะซิติลโคเอโมเลกุลที่สองเกิดเป็นมาเลต (malate) โดยอาศัยเอนไซม์มาเลตซินเทส (malate synthase) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา โดยในวัฏจักรไกลออกซีเลตแบบไม่เต็มวงจะไม่มีเอนไซม์มาเลตดีไฮโดรจีเนส (malate dehydrogenase) เพื่อเปลี่ยนมาเลต (malate) ไปเป็นออกซาโลอะซิเตต (oxaloacetate) (รูปที่ 2.6 (IV)) (Berg และคณะ, 2002; Zelle และคณะ, 2008)

2.5 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดมาลิก

2.5.1 ชนิดของจุลินทรีย์

ในช่วงแรกของการผลิตกรดมาลิก ส่วนใหญ่ผลิตโดยการสกัดจากน้ำแอปเปิ้ลหรือเปลือกไข่ซึ่งมีปริมาณกรดมาลิกน้อยกว่าร้อยละ 1 ทำให้มีการพัฒนากระบวนการผลิตกรดมาลิกให้ได้ผลผลิตมากขึ้น จากการสังเคราะห์ทางเคมีและการใช้เอนไซม์มาทดแทนการผลิตแบบดั้งเดิม แต่การผลิตด้วยกระบวนการทางเคมีก็มีข้อเสียคือ ต้องใช้ความร้อนและแรงดันสูง นอกจากนี้ยังไม่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม ทำให้มีความสนใจในการผลิตกรดมาลิกด้วยกระบวนการทางชีวภาพโดยจุลินทรีย์ ซึ่งจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะมีอัตราการผลิตกรดมาลิกที่แตกต่างกัน โดยจุลินทรีย์ที่ผลิตกรดมาลิกส่วนใหญ่จะอยู่ในกลุ่ม *Aspergillus* spp. และ *Penicillium* spp. โดยเชื้อ *Aspergillus* spp. ถูกนำมาใช้อย่างมากในการผลิตกรดมาลิก ดังตารางที่ 2.1 เนื่องจาก *Aspergillus* spp. สามารถผลิตกรดมาลิกผ่านวัฏจักรกรดไตรคาร์บอกซิลิก ทำให้สามารถผลิตกรดมาลิกได้ในปริมาณที่สูง แต่ก็มีข้อเสียคือ ในการผลิตกรดมาลิกจะมีการผลิตอะฟลาทอกซินร่วมด้วยทำให้เป็นอันตรายต่อผู้บริโภคเมื่อนำมารับประทาน (Dai และคณะ, 2018)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 แสดงตัวอย่างของจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตกรดมาลิกได้

จุลินทรีย์	กรดมาลิก (กรัมต่อลิตร)	อัตราการผลิต (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)	ผลได้ (กรัมต่อกรัม)	อ้างอิง
<i>Aspergillus flavus</i>	58	0.27	0.58	Dai และคณะ (2018)
<i>A. flavus</i> ATCC 13697	113	0.59	0.94	Battat และคณะ (1991)
<i>A. oryzae</i> NRRL 3488	30.27	0.64	0.67	Knuf และคณะ (2013)
<i>A. oryzae</i> DSM 1863	58.16	0.16	0.51	Knuf และคณะ (2013)
<i>Penicillium oxalicum</i> CBPS-3F-Ts	32.16	0.45	-	Ochsenreither และ คณะ (2014)
<i>P. viticola</i> 152	131	1.36	1.00	Ochsenreither และ คณะ (2014)
<i>P. sclerotiorum</i> K302	71.67	1.00	0.69	Ochsenreither และ คณะ (2014)

ที่มา : Dai และคณะ (2018)

2.5.2 ชนิดของแหล่งคาร์บอน

การใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตกรดมาลิกได้รับความนิยมเป็นอย่างมาก เพราะสามารถให้อัตราการผลิตและผลผลิตสูงกว่าน้ำตาลชนิดอื่นๆ เช่น น้ำตาลฟรุกโตส และราฟิโนส เป็นต้น ภายใต้สภาวะการหมักเดียวกัน ซึ่งการใช้น้ำตาลบริสุทธ์เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตกรดมาลิกจะมีต้นทุนที่สูงขึ้น ทำให้มีการมองหาวัสดุชนิดอื่นๆ ที่มีราคาถูกเพื่อนำมาใช้แทนน้ำตาลบริสุทธ์ เช่น กากน้ำตาลถั่วเหลือง ซังข้าวโพด และแก๊สผสม เป็นต้น ดังตารางที่ 2.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.2 แสดงการผลิตกรดมาลิกจากจุลินทรีย์โดยใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ

แหล่งคาร์บอน	เชื้อจุลินทรีย์	อุณหภูมิที่ เจริญเติบโต (องศา เซลเซียส)	กรดมาลิก (กรัมต่อ ลิตร)	ผลได้ (กรัมต่อ กรัม)	อ้างอิง
น้ำตาลกลูโคส	<i>Aureobasidium pullulans</i>	25	54.9	0.61	Cheng และคณะ (2017)
น้ำตาลซูโครส	<i>A. pullulans</i>	25	54.5	0.61	Cheng และคณะ (2017)
น้ำตาลฟรุกโตส	<i>A. pullulans</i>	25	43.2	0.51	Cheng และคณะ (2017)
กากน้ำตาลหัว เหลือง	<i>A. pullulans</i>	25	38.8	0.45	Cheng และคณะ (2017)
เส้นใยข้าวโพด	<i>Thermobifida fusca</i> muC-16	55	21.5	0.43	Khan และคณะ (2014)
ซังข้าวโพด	<i>Rhizopus delemar</i> HF-119	30	60.0	0.48	Li และคณะ (2014)
	<i>R. delemar</i> HF-121	30	121.8	0.97	Li และคณะ (2014)
น้ำกากส่า (Thin stillage)	<i>Aspergillus flavus</i> ATCC 13697	25	10.2	0.48	West (2011)
	<i>A. niger</i> ATCC 9029	25	1.0	0.05	West (2011)
	<i>A. niger</i> ATCC 9142	25	16.9	0.79	West (2011)
	<i>A. niger</i> ATCC 10577	25	16.4	0.79	West (2011)
กลีเซอรินดิบ	<i>A. niger</i> ATCC 9142	25	16.5	0.17	West (2015)
	<i>A. niger</i> ATCC 10577	25	20.3	0.20	West (2015)
	<i>A. niger</i> ATCC 12846	25	23.5	0.24	West (2015)
	<i>Ustilago trichophora</i> TZ1	30	108.0	0.26	Zambanini และ คณะ (2016)
แก๊สผสม	<i>Clostridium ljungdahli</i> DSM 13528/ <i>A. oryzae</i> DSM 1863	25	1.1	0.17	Oswald และคณะ (2016)
ไบโอออย	<i>A. oryzae</i> DSM 1863	32	0.0	0.0	Dorsam และคณะ (2016)

เอกสารนี้ที่มาจาก West (2017); Cheng และคณะ (2017) ศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากตารางที่ 2.2 จะเห็นได้ว่าการใช้น้ำตาลบริสุทธิ์และการใช้วัสดุอื่นๆ เป็นแหล่งคาร์บอน มีปริมาณกรดมาลิกและอัตราการผลิตใกล้เคียงกัน แต่ปัญหาในการใช้วัสดุกลีโคเซลลูโลสซึ่งเป็น วัสดุประเภทชีวมวลร่วมกับจุลินทรีย์ในการผลิตกรดมาลิก คือ ค่าใช้จ่ายในการใช้เอนไซม์ (เซลลูเลสและไซแลนเนส) ในการปรับสภาพและย่อยสลายชีวมวลเพื่อให้ได้น้ำตาลกลูโคสหรือไซโลสที่สามารถนำไปใช้ในการหมักได้ ซึ่งการย่อยสลายวัสดุกลีโคเซลลูโลสจะต้องอาศัยทั้งวิธีทางกายภาพ เคมี และเอนไซม์ร่วมกันเพื่อผลิตน้ำตาลกลูโคสจากเซลลูโลส และน้ำตาลไซโลสจากไซแลน

จากรายงานของ Li และคณะ (2014) ได้ศึกษาการใช้ซังข้าวโพดที่ผ่านการย่อยสลายแล้ว เป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *R. delemar* HF-119 เพื่อผลิตกรดมาลิก โดยทำการย่อยสลายซังข้าวโพดด้วยกรดซัลฟูริกความเข้มข้นร้อยละ 40 โดยปริมาตร และให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 160 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำกากของแข็งที่เหลือมาย่อยต่อด้วยเอนไซม์เซลลูเลส และ β -glucosidase เพื่อให้ได้น้ำตาลกลูโคสและไซโลส โดยสามารถผลิตกรดมาลิกได้ 60.0 กรัมต่อ ลิตร มีค่าผลได้เท่ากับ 0.48 กรัมต่อกรัม และเมื่อใช้เชื้อ *R. delemar* HF-121 ในการผลิตกรดมาลิก โดยใช้ซังข้าวโพดที่ผ่านการย่อยสลายแล้วเป็นแหล่งคาร์บอน สามารถผลิตกรดมาลิกได้ 121.8 กรัม ต่อลิตร และมีค่าผลได้เท่ากับ 0.97 กรัมต่อกรัม พบว่าการใช้น้ำตาลกลูโคสและไซโลสที่ได้จากการย่อยสลายซังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน เชื้อสายพันธุ์ *R. delemar* HF-121 สามารถผลิตกรดมาลิก ได้ดีกว่าเชื้อสายพันธุ์ *R. delemar* HF-119

จากรายงานของ Oswald และคณะ (2016) ได้มีการผลิตกรดมาลิกจากแก๊สผสม (ประกอบด้วย อะซิเตด เอทานอล บิวทานอล และ 2,3-บิวเทนไดออล) จากเชื้อ *A. oryzae* โดย ขั้นตอนแรกทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium ljungdahli* ในอาหารที่มีฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอน ในสภาวะไม่มีออกซิเจน เพื่อให้ได้แก๊สผสม หลังจากนั้นนำแก๊สผสมที่ได้ไปพ่นลงในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพที่ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *A. oryzae* ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน และไนโตรเจนจำกัด เพื่อแยกอะซิเตดออกจากแก๊สชนิดอื่นๆ และเปลี่ยนอะซิเตดไปเป็นกรดมาลิก ซึ่งเชื้อ *A. oryzae* สามารถผลิตกรดมาลิกได้ 4.34 กรัมต่อลิตร

จากการรายงานของ Dorsam และคณะ (2016) ได้ศึกษาการใช้ pyrolysis oil เพื่อส่งเสริมการผลิตกรดมาลิกโดยเชื้อ *A. oryzae* DSM 1863 ซึ่ง pyrolysis oil สามารถผลิตได้จากฟางข้าวสาลี พบว่าเมื่อนำ pyrolysis oil ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 เติมลงในอาหารที่เพาะเลี้ยงเชื้อ *A. oryzae* DSM 1863

pyrolysis oil ช่วยส่งเสริมการผลิตกรดมาลิก นอกจากนี้ pyrolysis oil ประกอบไปด้วย ไบโอดีออย โดยการใส่ไบโอดีออยในปริมาณที่เหมาะสมยังช่วยส่งเสริมการผลิตกรดมาลิกได้อีกด้วย แต่เมื่อนำไบโอดีออยความเข้มข้นร้อยละ 1 และร้อยละ 2 เติมลงในอาหารที่เพาะเลี้ยงเชื้อ *T. fusca* muC พบว่าการผลิตกรดมาลิกลดลง เนื่องจากความเข้มข้นของไบโอดีออยที่มากเกินไปยังการผลิตกรดมาลิก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.3 อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C:N ratio)

อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนถือว่าเป็นส่วนประกอบที่สำคัญในอาหาร เนื่องจากถ้ามีปริมาณแหล่งไนโตรเจนน้อยเกินไปและมีปริมาณแหล่งคาร์บอนมากเกินไป ส่งผลให้อัตราการเจริญเติบโตของเซลล์เพิ่มขึ้นในระยะแรกแล้วจะหยุดการเติบโตของเซลล์ เนื่องจากมีปริมาณแหล่งไนโตรเจนที่จำกัด และถ้ามีอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนมากเกินไป จะทำให้เกิดการยับยั้งโดยสารตั้งต้นโดยเซลล์จะเสียประสิทธิภาพในการเจริญและการผลิตผลิตภัณฑ์ (Goldberg และคณะ, 2006) ถ้ามีปริมาณแหล่งคาร์บอนคงที่แล้วมีปริมาณแหล่งไนโตรเจนน้อยเกินไป ส่งผลให้อัตราการเจริญเติบโตของเซลล์จำกัดแต่เพิ่มการผลิตกรดมาลิก นอกจากนี้ถ้ามีปริมาณแหล่งไนโตรเจนมากเกินไปส่งผลให้ส่งเสริมอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์แต่จะยับยั้งการผลิตกรดมาลิก (Cheng และคณะ, 2017)

2.6 การประยุกต์ใช้กรดมาลิก

2.6.1 อุตสาหกรรมอาหาร

กรดมาลิกเป็นกรดธรรมชาติรูปแบบหนึ่งจึงนิยมใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร โดยเฉพาะในน้ำอัดลม น้ำผลไม้ และการผลิตไวน์ กรดมาลิกเป็นผลิตภัณฑ์ที่ให้รสชาติและสารเพิ่มความคงทนในอาหาร แต่ต้องใช้ในปริมาณที่เหมาะสม ถ้าใช้ในปริมาณมากหรือน้อยเกินไปจะทำให้รสชาติที่ผิดปกติเปลี่ยนแปลง โดยการใช้กรดสองชนิดหรือมากกว่าสองชนิดจะเพิ่มรสชาติและเอกลักษณ์เฉพาะตัวในอาหารชนิดนั้น เช่น การใช้กรดมาลิก และกรดทาร์ทาริกที่เป็นองค์ประกอบพื้นฐานของไวน์ประมาณร้อยละ 90 ของปริมาณกรดทั้งหมด จะทำให้ไวน์มีกลิ่นและกรดที่เป็นเอกลักษณ์เฉพาะตัว (Antonelli และคณะ, 2008)

2.6.2 อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง

จากมลภาวะในสิ่งแวดล้อม ไม่ว่าจะเป็นรังสีอัลตราไวโอเลต และปัจจัยอื่นๆ ที่ก่อให้เกิดริ้วรอยก่อนวัยนั้น ส่งผลให้อุตสาหกรรมเครื่องสำอางเกิดการตื่นตัวในการพัฒนาส่วนผสมต่อต้านริ้วรอยสำหรับการดูแลผิว ซึ่งกรดอินทรีย์ที่มีกลุ่มไฮดรอกซิล หรือเรียกว่า AHA (Alpha Hydroxy Acids) หรือโดยมีชื่อทั่วไปว่า “กรดผลไม้” ซึ่งเป็นสารที่สามารถพบได้ในธรรมชาติโดยเฉพาะในผลไม้ที่มีรสเปรี้ยว โดยกรดผลไม้จะมีสรรพคุณในการเพิ่มการเผาผลาญของเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้ผิวมีความเปลี่ยนแปลง ช่วยลดริ้วรอยบนผิว เพิ่มความชุ่มชื้น และสร้างเคราติน โดยกรดผลไม้มีหลายชนิดแต่ที่นิยมใช้คือ กรดไกลโคลิก กรดแอลมาลิก กรดแลคติก และกรดซิตริก ซึ่งกรดไกลโคลิก และกรดแอลมาลิกนั้นได้มีการทดลอง พบว่าสามารถลดริ้วรอยและกระตุ้นการผลิตเซลล์ผิวได้ดีที่สุด (Nicolettil และคณะ, 1999)

2.6.3 อุตสาหกรรมสิ่งทอ

กรดมาลิกถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมสิ่งทอ ในการเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในน้ำยาที่จะช่วยในการรักษาผ้าและทำให้ผ้าสามารถยืดหยุ่นได้ดี โดยจะเร่งปฏิกิริยาในขั้นตอนการเติมพอลิไฮดรอกซีแอลกอฮอล์ (polyhydric alcohols) ทำให้เกิดปฏิกิริยาได้ดียิ่งขึ้น นอกจากการใช้กรดมาลิกแล้วยังไม่ทราบถึงข้อดี ข้อเสีย ข้อควรระวัง และข้อห้ามในการใช้กรดมาลิกในอุตสาหกรรมสิ่งทอ

สามารถใช้กรดชนิดอื่นๆได้ เช่น กรดซัคซินิก กรดไกลโคลิก กรดซิตริก และกรดทาร์ทาริก เป็นต้น (Pushpa, 2002)

2.6.4 อุตสาหกรรมเกษตร

ปัญหาในระหว่างการขนส่งมะม่วงและส้ม คือการเน่าเสียซึ่งเกิดจากเชื้อ *Salmonella enterica ser.Saintpaul* และ *Escherichia coli* O157 : H7 จึงได้มีการใช้กรด มาลิกร่วมกับโซมและโพแทสเซียมซอร์เบตเพื่อเป็นยาต่อต้านเชื้อ *S. enterica ser. Saintpaul* และ *E. coli* O157 : H7 ในระหว่างการขนส่งมะม่วงและส้ม โดยสามารถต้านเชื้อเป็นเวลา 21 วัน ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส และมีความปลอดภัยต่อผู้บริโภค เมื่อทดสอบกลิ่นและรสของมะม่วงและส้มที่ฉายาต้านเชื้อ *S. enterica ser. Saintpaul* และ *E. coli* O157 : H7 กับมะม่วงและส้มที่ไม่ฉายาต้านเชื้อ *S. enterica ser. Saintpaul* และ *E. coli* O157 : H7 พบว่าการฉายาต่อต้านเชื้อ *S. enterica ser. Saintpaul* และ *E. coli* O157 : H7 ไม่มีผลต่อกลิ่นและรสของมะม่วงและส้ม (Raybaudi-Massilia และคณะ, 2012)

2.6.5 อุตสาหกรรมยา

กรดมาลิกถูกนำไปใช้ร่วมกับกรดเบนโซอิกและกรดซาลิไซลิก เพื่อรักษาแผลไฟไหม้ ฝี หนอง แผลฟกช้ำ และแผลในปาก นอกจากนี้กรดมาลิกยังสามารถเข้าสู่กระแสเลือดและกล้ามเนื้อ เพื่อไปรักษาความผิดปกติของตับ (Piyarom และคณะ, 1997)

2.7 กากน้ำตาล

ในการหาแหล่งคาร์บอนที่มีราคาถูกและมีสารอาหารที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ ถือว่าเป็นเรื่องสำคัญเพราะช่วยลดต้นทุนในการผลิตผลิตภัณฑ์ต่างๆ ซึ่งกากน้ำตาลถือว่าเป็นตัวเลือกหนึ่งที่น่าสนใจ เนื่องจากมีราคาถูกเพราะเป็นของเหลือทิ้งจากโรงงานผลิตน้ำตาลทราย นอกจากนี้ยังมีสารอาหารที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ ประกอบไปด้วย น้ำร้อยละ 20.0 น้ำตาลซูโคส ร้อยละ 32.0 น้ำตาลกลูโคสร้อยละ 14.0 น้ำตาลฟรุคโตสร้อยละ 16.0 ไนโตรเจน กรดอิสระหรือสารที่ละลายน้ำได้ร้อยละ 10.0 และอื่นๆ เช่น โพแทสเซียมออกไซด์ แคลเซียมออกไซด์ และซัลเฟตที่ตกค้างอีกร้อยละ 8.0 (Olbrich, 2006) ดังตารางที่ 2.3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.3 แสดงส่วนประกอบของกากน้ำตาลอ้อย

ส่วนประกอบ		กากน้ำตาลอ้อย (ร้อยละ)		
น้ำ		20.0		
สารอินทรีย์	น้ำตาล	ซูโครส	32.0	62.0
		กลูโคส	14.0	
		ฟรุกโตส	16.0	
		น้ำตาลอินเวส	-	
	ราฟไฟโนส	-		
ไม่ใช้น้ำตาล	ไนโตรเจน กรดอิสระ และสารที่ละลายน้ำได้	10.0		
สารอนินทรีย์ (เถ้า)	SiO_2	0.5	8.0	
	K_2O	3.5		
	CaO	1.5		
	MgO	0.1		
	P_2O_5	0.2		
	Na_2O			
	Fe_2O_3			
	Al_2O_3	0.2		
	คาร์บอนที่ตกค้าง			
	ซิลิเกตที่ตกค้าง	1.6		
	คลอไรด์	0.4		
100				

ที่มา : Olbrich (2006)

แต่ปัญหาของการนำกากน้ำตาลอ้อยไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอน คือ การมีสารยับยั้งการเจริญเติบโต จำพวกโลหะหนักอยู่เป็นจำนวนมาก ดังนั้นจึงต้องมีการนำกากน้ำตาลอ้อยไปผ่านการปรับสภาพก่อนเพื่อกำจัดโลหะหนักออกก่อนที่จะนำไปใช้ (Lewis และ Bartholomew, 1994)

2.7.1 การปรับสภาพกากน้ำตาล

2.7.1.1 การตกตะกอนร่วมกับไฮดรอกไซด์

การปรับสภาพกากน้ำตาลโดยการตกตะกอนร่วมกับไฮดรอกไซด์เป็นวิธีการกำจัด

ไอออนของโลหะหนักออกจากสารละลาย ที่ได้รับความนิยมเพราะมีต้นทุนต่ำและง่ายต่อการควบคุม เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ค่าที่เอช โดยวิธีการนี้จะเป็นการจับตัวกันของไฮดรอกไซด์กับไอออนโลหะหนักแล้วเกิดการตกตะกอน ไม่วาร์ณใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งยังมีให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เช่น แคลเซียมไฮดรอกไซด์และโซเดียมไฮดรอกไซด์ทำปฏิกิริยาร่วมกันจับไอออนของทองแดงและโครเมียมให้ตกตะกอน ถึงแม้ว่าวิธีนี้จะเป็นวิธีที่ได้รับความนิยมแต่ก็มีข้อจำกัด คือ 1. ตะกอนที่เกิดจากการรวมตัวกันจะมีความหนาแน่นต่ำทำให้ยากต่อการแยกตะกอนออกจากสารละลายที่ต้องการ 2. ไฮดรอกไซด์ของโลหะหนักบางชนิดมีคุณสมบัติเป็นแอมโฟเทอริก คือ การที่ไอออนของสารเป็นได้ทั้งกรดและด่างส่งผลให้ค่าพีเอชไม่แน่นอน แต่การมีค่าพีเอชที่เหมาะสมทำให้ไอออนของโลหะหนักอื่นๆ กลับมาอยู่ในรูปของสารละลายได้ 3. เมื่อเกิดการจับตัวกันเป็นสารประกอบเกิดเป็นสารที่มีโครงสร้างซับซ้อนทำให้ไปยับยั้งการตกตะกอนของโลหะไฮดรอกไซด์ (Fu และ Wang, 2011)

2.7.1.2 การตกตะกอนร่วมกับซัลไฟด์

การตกตะกอนร่วมกับซัลไฟด์ เป็นวิธีการตกตะกอนที่มีประสิทธิภาพสำหรับการตกตะกอนไอออนของโลหะหนักที่เป็นสารพิษ ซึ่งมีข้อดี คือ 1. ความสามารถในการละลายของซัลไฟด์จะตกตะกอนน้อยกว่าการตกตะกอนด้วยไฮดรอกไซด์แต่ตะกอนที่ได้จะไม่มีคุณสมบัติการเป็นแอมโฟเทอริกทำให้การตกตะกอนด้วยซัลไฟด์สามารถตกตะกอนได้และทำให้ได้ค่าพีเอชที่กว้างมากกว่า เมื่อเทียบกับการตกตะกอนด้วยไฮดรอกไซด์ 2. ตะกอนที่ได้มีความหนาแน่นต่ำและมีคุณสมบัติการแยกน้ำได้ดี จึงง่ายในการแยกตะกอนออกจากสารละลายที่ต้องการ (Fu และ Wang, 2011)

2.7.1.3 การตกตะกอนด้วยคีเลต

จากกระบวนการตกตะกอนทางเคมีแบบดั้งเดิมนั้นมีข้อจำกัด ทำให้เกิดการประยุกต์ใช้สารคีเลตเพื่อตกตะกอนไอออนโลหะหนัก จากรายงานของ Matlock และคณะ (2002) ได้ทำการตรวจสอบประสิทธิภาพของสารที่ใช้ในการตกตะกอนไอออนโลหะหนักที่นิยมใช้ในเชิงพาณิชย์ 3 ชนิด คือ โซเดียมไดเมทิลไดไธโकारบาเมต (sodiumdimethyl dithiocarbamate) โพแทสเซียม (potassium) หรือโซเดียมไธโอคาร์บอเนต (sodiumthiocarbonate) และไตรเมอร์แคปโทเทียซีน (trimercaptotriazine) พบว่าสารทั้ง 3 ชนิด สามารถตกตะกอนไอออนโลหะหนักได้แต่ก่อให้เกิดปัญหาทางด้านสิ่งแวดล้อม จึงได้มีการคิดค้นสารคีเลตชนิดใหม่ที่สามารถนำไปใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้นและไม่ก่อให้เกิดปัญหาทางด้านสิ่งแวดล้อม คือ 1,3-benzenediamidoethanethiol โดยมีความสามารถในการตกตะกอนปรอทในสารละลาย และจากรายงานของ Fu และ Wang (2011) ได้มีการใช้ 1,3,5-hexahydrotriazinedithiocarbamate ในการตกตะกอนไอออนโลหะหนักในสารละลาย พบว่าสามารถลดปริมาณไอออนโลหะหนักได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยมีปริมาณไอออนโลหะหนักในสารละลายเหลือต่ำกว่า 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

2.7.1.4 การแลกเปลี่ยนไอออน (ion excheng)

กระบวนการแลกเปลี่ยนไอออนมีการใช้กันอย่างแพร่หลายในการกำจัดไอออนโลหะหนักซึ่งมีข้อดี คือ สามารถกำจัดโลหะหนักได้อย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพ ซึ่งเรซินเป็นตัวกลางที่นิยมใช้ในการแลกเปลี่ยนไอออนโลหะหนักในสารละลาย โดยเรซินมีทั้งเรซินธรรมชาติและเรซินสังเคราะห์ โดยเรซินสังเคราะห์เป็นที่นิยมเนื่องจากมีประสิทธิภาพในการกำจัดไอออนบวกของโลหะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นับว่าตีพิมพ์เผยแพร่ในเชิงพาณิชย์
หากออกจากรายการเอกสารนี้ ส่วนเรซินธรรมชาติที่นิยมใช้ คือ ซีโอไลต์ เช่น แร่ซิลิเกต เนื่องจากมี
ไม่วากรณ์ใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งหากมีการนำไปใช้

ต้นทุนต่ำและสามารถหาซื้อได้ง่าย โดยตัวแลกเปลี่ยนไอออนบวกที่นิยมใช้จะเป็นเรซินชนิดกรดแก่ จำพวกกลุ่มซัลโฟนิก และเรซินชนิดกรดอ่อนจำพวกกลุ่มคาร์บอกซิลิก โดยไฮโดรเจนไอออนในกลุ่มซัลโฟนิกและคาร์บอกซิลิกจะทำหน้าที่เป็นตัวแลกเปลี่ยนไอออนบวกกับโลหะหนัก ซึ่งความสามารถในการกำจัดไอออนโลหะหนักจะขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น ค่าพีเอช อุณหภูมิ ความเข้มข้นเริ่มต้นของไอออนโลหะหนัก และเวลาที่ใช้ในการแลกเปลี่ยนไอออน (Fu และ Wang, 2011)

2.7.1.5 การดูดซับด้วยถ่านกัมมันต์

ถ่านกัมมันต์เป็นตัวดูดซับที่นิยมใช้อย่างแพร่หลายในการกำจัดไอออนโลหะหนัก เนื่องจากโมเลกุลของถ่านกัมมันต์มีพื้นที่ผิวมากสำหรับการดูดซับไอออนโลหะหนัก ทำให้สามารถดูดซับไอออนโลหะหนักออกจากสารละลายได้ดี แต่ในปัจจุบันแหล่งผลิตถ่านกัมมันต์ลดน้อยลง ทำให้ถ่านกัมมันต์มีราคาสูงขึ้นส่งผลให้เพิ่มต้นทุนในการผลิต นอกจากนี้เพื่อลดต้นทุนในการผลิตได้มีการใช้สารประกอบอื่นแทน เช่น อัลจิเนต กรดแทนนิก แมกนีเซียม และสารลดแรงตึงผิว เป็นต้น (Fu และ Wang, 2011)

2.7.1.6 ตัวดูดซับต้นทุนต่ำ

เนื่องจากถ่านกัมมันต์เป็นตัวดูดซับไอออนโลหะหนักได้ดีแต่มีราคาแพง ทำให้มีการค้นหาตัวดูดซับที่มีราคาถูกมาทดแทน โดยเป็นของเหลือทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมและทางการเกษตร (Fu และ Wang, 2011) จากรายงานของ Bhainsa และ D'Souza (2008) ได้ทำการค้นหาตัวดูดซับเพื่อทดแทนถ่านกัมมันต์ โดยพบว่าแร่เคโอลิไนต์และแรมอนต์มอร์สไลต์ที่พบได้ตามธรรมชาติเป็นตัวดูดซับไอออนโลหะหนักที่มีประสิทธิภาพ Jiang และคณะ (2010) พบว่าแร่เคโอลิไนต์ที่ได้จากเมือง Longyan ในประเทศจีน สามารถดูดซับตะกั่ว แคดเมียม นิกเกิล และทองแดงออกจากสารละลายได้ โดยสามารถดูดซับได้อย่างรวดเร็วในเวลา 30 นาที และแร่เคโอลิไนต์ สามารถดูดซับตะกั่วออกจากสารละลายได้ โดยมีความเข้มข้นลดลงจาก 160.00 มิลลิกรัมต่อลิตร เหลือ 8.00 มิลลิกรัมต่อลิตร

2.7.1.7 การกรองด้วยอัลตราฟิวเตรชั่น

การกรองด้วยอัลตราฟิวเตรชั่น (Ultrafiltration ; UF) เป็นการทำงานโดยใช้เมมเบรนในการกำจัดวัสดุที่อยู่ในสารละลายและคอลลอยด์ภายใต้สภาวะที่มีความกดอากาศต่ำ เนื่องจากขนาดรูพรุนของเยื่อกรองมีขนาดใหญ่กว่าไอออนโลหะหนักที่ละลายได้ในรูปแบบของไฮเดรตไอออน หรือเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ไอออนเหล่านี้จึงสามารถผ่านเยื่อกรองได้ เพื่อให้ได้ประสิทธิภาพในการกำจัดที่สูงขึ้น จึงต้องกรองสารละลายด้วยวิธี Micellar enhanced ultrafiltration (MEUF) และ Polymer enhanced ultrafiltration (PEUF)

Micellar enhanced ultrafiltration (MEUF) เป็นวิธีการแยกที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดไอออนโลหะหนักออกจากสารละลาย วิธีการนี้ใช้หลักการเติมสารลดแรงตึงผิวลงใน

สารละลาย เมื่อความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวในสารละลายมากพอที่จะส่งผลให้โมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวรวมตัวกันเป็นไมเซลล์ที่สามารถจับกับไอออนโลหะหนักกลายเป็นสารประกอบขนาดใหญ่กว่ารูพรุนของเยื่อกรองได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับภาควิชาวิศวกรรมเพื่อการศึกษาค้นคว้าเท่านั้น เมื่อนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งหากมีการนำไปใช้

ใหญ่ทำให้ไม่สามารถผ่านรูพรุนของเยื่อกรองอัลตราฟิวเตรชั่นได้ โดยสารลดแรงตึงผิวที่นิยมใช้ เช่น โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (Sodimdodecylsulfate) ซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิวที่มีประจุลบจะถูกนำมาใช้ในการกำจัดไอออนโลหะหนักใน MEUF ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ดังนั้นความสามารถในการกำจัดไอออนโลหะหนักด้วยวิธี MEUF จะขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย ได้แก่ ลักษณะ ความเข้มข้นของไอออนโลหะหนัก ชนิดของสารลดแรงตึงผิว ค่าพีเอช ความแรงของไอออน และพารามิเตอร์ที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของเมมเบรน

Polymer enhanced ultrafiltration (PEUF) เป็นวิธีที่แยกไอออนโลหะหนักหลายชนิดออกจากสารละลาย โดยวิธี PEUF จะใช้พอลิเมอร์ที่ละลายน้ำได้ในการจับกับไอออนโลหะหนักเพื่อให้ไอออนโลหะหนักมีโมเลกุลขนาดใหญ่ขึ้นหรือมีโครงสร้างที่ซับซ้อนมากขึ้น เมื่อกรองผ่านเยื่อกรองอัลตราฟิวเตรชั่นโมเลกุลของไอออนโลหะหนักก็ไม่สามารถผ่านรูของเมมเบรนได้ ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของ PEUF ได้แก่ อัตราส่วนระหว่างไอออนโลหะหนักต่อพอลิเมอร์ ค่าพีเอช และชนิดของพอลิเมอร์ที่ใช้กับชนิดของไอออนโลหะหนัก (Fu และ Wang, 2011)

2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.8.1 การผลิตกรดพอลิมาลิกจาก *Aureobasidium pullulans* โดยใช้กากน้ำตาลถั่วเหลืองเป็นแหล่งคาร์บอน

Cheng และคณะ (2017) ได้ทำการศึกษาการผลิตกรดพอลิมาลิกโดยใช้กากน้ำตาลถั่วเหลืองเป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยง *Aureobasidium pullulans* พบว่าเมื่อใช้กากน้ำตาลถั่วเหลืองที่ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกและแคลเซียมไฮดรอกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอน สามารถลดสารที่ก่อให้เกิดความหนืดได้มากถึงร้อยละ 20 โดยปริมาตร ซึ่งสารที่ก่อให้เกิดความหนืดนี้ประกอบไปด้วยน้ำมันถั่วเหลือง เซสเซลล์ และตะกอนของแคลเซียมคาร์บอเนต แต่เมื่อใช้กากน้ำตาลถั่วเหลืองที่ไม่ปรับสภาพเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าการผลิตกรดพอลิมาลิกลดลง เนื่องจากมีสารที่ก่อให้เกิดความหนืด ทำให้การถ่ายเทออกซิเจนไปยังเซลล์ลดลง นอกจากนี้แคลเซียมไฮดรอกไซด์ยังสามารถตกตะกอนไอออนโลหะหนักในกากน้ำตาลถั่วเหลืองได้ ซึ่งไอออนโลหะหนักจะไปยับยั้งการเจริญของเซลล์และเมแทบอลิซึมที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์กรดพอลิมาลิก

นอกจากนี้ Cheng และคณะ (2017) ได้ศึกษาการใช้ corn steep liquor เป็นแหล่งไนโตรเจน ที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายเนื่องจากมีราคาถูก โดยทำการเปรียบเทียบการเติม corn steep liquor ความเข้มข้น 2.5 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน และไม่มีการเติม corn steep liquor ในอาหารที่มีกากน้ำตาลถั่วเหลืองที่ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกและแคลเซียมไฮดรอกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าอาหารที่ไม่เติม corn steep liquor สามารถผลิตกรดพอลิมาลิกได้มากกว่าอาหารที่มีการเติม corn steep liquor ความเข้มข้น 2.5 กรัมต่อลิตร โดยมากกว่า 0.49 กรัมต่อกรัม เนื่องจากกากน้ำตาลถั่วเหลืองที่ปรับสภาพอุดมไปด้วยแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ที่ประกอบไปด้วย

โปรตีน และเปปไทด์ที่ละลายน้ำได้ร้อยละ 2 จึงเพียงพอต่อการเพาะเลี้ยง *A. pullulans* เพื่อผลิตกรดพอลิมาลิก

ไม่วารณใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.8.2 การผลิตกรดพอลิมาลิกและกรดมาลิกจากน้ำตาลไซโลสและซังข้าวโพดที่ผ่านการย่อยสลายโดย *Aureobasidium pullulans* สายพันธุ์ YJ6-11

Zou และคณะ (2016) ได้ทำการศึกษาการผลิตกรดพอลิมาลิกและกรดมาลิกจากเชื้อ *Aureobasidium pullulans* สายพันธุ์ YJ6-11 ที่คัดแยกได้จากเมือง Jinyun ในประเทศจีน ในการศึกษาได้ทำการผลิตกรดพอลิมาลิกด้วยการหมักแบบกะ (Batch fermentation) และแบบกึ่งกะ (Fed batch fermentation) โดยในการหมักแบบกะที่มีน้ำตาลไซโลสความเข้มข้น 80 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนในระยะเวลา 74 ชั่วโมง สามารถผลิตกรดพอลิมาลิกได้ 32.1 กรัมต่อลิตร (หลังจากการย่อยสลายได้กรดมาลิก 36.4 กรัมต่อลิตร) อัตราการผลิต 0.43 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง สำหรับการหมักแบบกึ่งกะที่มีน้ำตาลไซโลสความเข้มข้น 80 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ในระยะเวลา 156 ชั่วโมง สามารถผลิตกรดพอลิมาลิกได้ 80.4 กรัมต่อลิตร (หลังจากการย่อยสลายได้กรดมาลิก 91.2 กรัมต่อลิตร) อัตราการผลิต 0.52 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และหลังจากการเติมน้ำตาลไซโลสเพิ่มลงในอาหาร พบว่าการผลิตกรดพอลิมาลิกคงที่ตลอดการหมัก ซึ่งชี้ให้เห็นว่าการผลิตกรดพอลิมาลิกไม่มีผลยับยั้งการหมักหรือการเจริญของเซลล์ แสดงให้เห็นว่าการหมักกรดพอลิมาลิกโดยวิธีการหมักแบบกึ่งกะ และใช้เซลล์อิสระเป็นวิธีที่ดีในการผลิตกรดพอลิมาลิก

นอกจากนี้ Zou และคณะ (2016) ได้ทำการศึกษาการนำซังข้าวโพดที่ย่อยสลายมาเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตกรดพอลิมาลิกจากเชื้อ *A. pullulans* YJ6-11 โดยใช้การหมักแบบกึ่งกะเนื่องจากซังข้าวโพดที่ย่อยสลายส่วนใหญ่ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลไซโลส เมื่อใช้ซังข้าวโพดที่ย่อยสลายที่มีความเข้มข้น 90 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ในระยะเวลา 72 ชั่วโมง สามารถผลิตกรดพอลิมาลิกได้ 28.6 กรัมต่อลิตร (ภายหลังการย่อยได้กรดมาลิก 32.4 กรัมต่อลิตร) อัตราการผลิต 0.40 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ซึ่งอัตราการผลิตของกรดพอลิมาลิกมีความใกล้เคียงกับการหมักโดยใช้น้ำตาลบริสุทธิ์ (น้ำตาลไซโลสและน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน) โดยทั่วไปการย่อยสลายซังข้าวโพดจะเกิดสารประกอบที่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง เช่น 5-ไฮโดรเมทิลเฟอฟูรัล เพอฟูรัล กรดอะซิติก และสารประกอบฟีนอลิก ซึ่งอาจส่งผลต่อการเจริญของเซลล์

2.8.3 การผลิตออร์นิตินจากกากน้ำตาลอ้อยด้วย *Corynebacterium glutamicum* โดยการหมักแบบต่อเนื่อง

Xu และคณะ (2015) ได้ทำการศึกษาผลของการปรับสภาพกากน้ำตาลอ้อยต่อการผลิตออร์นิตินเนื่องจากกากน้ำตาลอ้อยมีความเข้มข้นที่สูงและสารอาหารในการเจริญของเซลล์ แต่กากน้ำตาลอ้อยยังมีไอออนโลหะหนักจำนวนมาก รวมทั้งแคลเซียม โพแทสเซียม แมกนีเซียม และทองแดง ซึ่งเป็นพิษต่อเซลล์และยับยั้งการเจริญของเซลล์ โดยที่ความเข้มข้นของไอออนโลหะหนักสามารถทำให้ลดลงได้ด้วยการตกตะกอน โดยในการศึกษานี้ได้ศึกษาการปรับสภาพ 5 วิธี คือ การปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริก การปรับสภาพด้วยพอลิอะคริลาไมด์ การปรับสภาพด้วยถ่านกัมมันต์ การปรับสภาพด้วยแคลเซียมไฮดรอกไซด์ และการปรับสภาพด้วยเฟอร์โรไซยาไนด์ พบว่าเชื้อ

Corynebacterium glutamicum ที่ใช้กากน้ำตาลอ้อยที่ปรับสภาพด้วยพอลิอะคริลาไมด์เป็นแหล่งไม่วางรณใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งยังมีเหตุเปลี่ยนแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คาร์บอน สามารถผลิตออร์นิตินได้สูงสุด 15.14 ± 0.66 กรัมต่อลิตร หลังจากที่ทำการเพาะเลี้ยง 72 ชั่วโมง และมีการใช้น้ำตาลคิดเป็นร้อยละ 95.37 และยังพบว่าปริมาณโลหะหนักและสารคอลลอยด์ ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับกรใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน *C. glutamicum* สามารถผลิตออร์นิตินได้ 15.47 ± 1.4 กรัมต่อลิตร และมีการใช้น้ำตาลคิดเป็นร้อยละ 95.4 ซึ่งมีความใกล้เคียงกับการใช้กากน้ำตาลอ้อยที่ปรับสภาพด้วยพอลิอะคริลาไมด์ ดังนั้นการปรับสภาพด้วยพอลิอะคริลาไมด์จึงเป็นวิธีการปรับสภาพที่เหมาะสมต่อการผลิตออร์นิตินโดย *C. glutamicum*

ตารางที่ 2.4 แสดงการผลิตออร์นิตินโดยการใช้น้ำตาลอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพด้วยวิธีที่แตกต่างกันเป็นแหล่งคาร์บอน

วิธีการปรับสภาพกากน้ำตาลอ้อย	ผลได้ออร์นิติน (โมลต่อโมล)	ออร์นิติน (กรัมต่อลิตร)
ไม่ผ่านการปรับสภาพ	0.19 ± 0.01	9.88 ± 0.77
กรดซัลฟูริก	0.20 ± 0.01	12.25 ± 0.58
พอลิอะคริลาไมด์	0.23 ± 0.01	15.14 ± 0.66
ถ่านกัมมันต์	0.20 ± 0.02	12.66 ± 1.13
แคลเซียมไฮดรอกไซด์	0.21 ± 0.01	13.37 ± 0.82
เฟอร์โรไซยาไนด์	0.21 ± 0.01	13.72 ± 0.98

ที่มา : Xu และคณะ (2015)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

3.1.1 กระจกบอทดวง

3.1.2 กระจกบอคน้ำกลั่น

3.1.3 ขวดบรรจุอาหาร (Duran)

3.1.4 ขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร

3.1.5 ขวดปรับปริมาตรขนาด 500 มิลลิลิตร

3.1.6 ขวดปรับปริมาตรขนาด 1000 มิลลิลิตร

3.1.7 ขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร

3.1.8 ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร

3.1.9 เครื่องกวนสารละลาย (Sterrier)

3.1.10 เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker) ยี่ห้อ NEW BRUNSWICK รุ่น Innova 4230 ประเทศแคนาดา

3.1.11 เครื่องชั่ง 3 ตำแหน่ง ยี่ห้อ AND รุ่น GF-800 ประเทศญี่ปุ่น

3.1.12 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Denver Instrument รุ่น SI-234 ประเทศเยอรมัน

3.1.13 เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) ยี่ห้อ HIRAYAMA รุ่น HV-25/50/85 ประเทศญี่ปุ่น

3.1.14 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) ยี่ห้อ HERMLE Labortechnik GmbH รุ่น Z326K ประเทศเยอรมัน

3.1.15 เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (Microcentrifuge) ยี่ห้อ Spectrafuge ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.1.16 เครื่องผสมสารละลาย (Vortex Mixer) ยี่ห้อ VELP Scientific ประเทศอิตาลี

3.1.17 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) ยี่ห้อ SHIMADZU รุ่น UV-1201V ประเทศญี่ปุ่น

3.1.18 เครื่องวัดค่าพีเอช (pH meter) ยี่ห้อ Seven Compact รุ่น S220-kit ประเทศเยอรมัน

3.1.19 จานเพาะเลี้ยงเชื้อ (Plate)

3.1.20 ชุดขาตั้งและแคลมป์จับ

3.1.21 ซ้อนตักสาร

3.1.22 ตะเกียงแอลกอฮอล์

3.1.23 ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) ยี่ห้อ Contherm รุ่น Polar 1000 ประเทศนิวซีแลนด์

3.1.24 ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air flow) ยี่ห้อ Issco รุ่น BV T123 ประเทศสหรัฐอเมริกา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 3.1.25 ตู้อบลมร้อน (Hot air oven) ยี่ห้อ Shel Lab รุ่น 1375 FX forced air oven
ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.1.26 โถดูดความชื้น
- 3.1.27 ที่วางหลอดทดลอง (Rack)
- 3.1.28 แท่งแก้วคนสาร
- 3.1.29 บิวเรต
- 3.1.30 บีกเกอร์
- 3.1.31 ปีเปตแก้ว
- 3.1.32 ปีเปตทิป (Pipette tip)
- 3.1.33 ไมโครปีเปต (Micropipettes หรือ Autopipettes)
- 3.1.34 ลูกยางดูดสาร
- 3.1.35 ลวดเขี่ยเชื้อ (loop)
- 3.1.36 หลอดเซนติฟิวก์ (Centrifuge tube)
- 3.1.37 หลอดทดลอง
- 3.1.38 หลอดไมโครเซนติฟิวก์ (Microcentrifuge tube หรือ Eppendorf tube)
- 3.1.39 หลอดหยดสาร
- 3.1.40 อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)

3.2 สารเคมี

- 3.2.1 3,5-Dinitrosalicylic acid ยี่ห้อ SIGMA ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.2.2 Agar ยี่ห้อ Himedia ประเทศอินเดีย
- 3.2.3 Alcohol 70%
- 3.2.4 Alcohol 95%
- 3.2.5 Ammonium Chloride (NH_4Cl) ยี่ห้อ Univar reagent ประเทศออสเตรเลีย
- 3.2.6 Calcium carbonate (CaCO_3) ยี่ห้อ Univar reagent ประเทศออสเตรเลีย
- 3.2.7 Calcium hydroxide ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) ยี่ห้อ Merck KGaA ประเทศเยอรมัน
- 3.2.8 Corn steep liquor (CSL) ยี่ห้อ SIGMA ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.2.9 Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) ยี่ห้อ Univar reagent
ประเทศออสเตรเลีย
- 3.2.10 Fructose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) ยี่ห้อ Fisher Chemical ประเทศอังกฤษ
- 3.2.11 Glucose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) ยี่ห้อ Huakang ประเทศจีน
- 3.2.12 Glycerol ยี่ห้อ Fisher Chemical ประเทศอังกฤษ
- 3.2.13 Hydrochloric acid (HCl) ยี่ห้อ Loba Chemie ประเทศอินเดีย
- 3.2.14 Hydroxy Naphthol Blue indicator grade ยี่ห้อ Loba Chemie ประเทศอินเดีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารสงวนลิขสิทธิ์สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มาใช้

- 3.2.15 Magnesium sulfate ($MgSO_4$) ยี่ห้อ Fluka Chemika ประเทศสวิสเซอร์แลนด์
- 3.2.16 Magnesium sulfate heptahydrate ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) ยี่ห้อ Fluka Chemika ประเทศสวิสเซอร์แลนด์
- 3.2.17 Methanol ยี่ห้อ Honey well ประเทศเกาหลี
- 3.2.18 Phenol ยี่ห้อ Fisher Chemical ประเทศอังกฤษ
- 3.2.19 Potassium chloride (KCl) ยี่ห้อ Univar reagent ประเทศออสเตรเลีย
- 3.2.20 Potassium ferrocyanide ($K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$) ยี่ห้อ Univar reagent ประเทศออสเตรเลีย
- 3.2.21 Potassium sulfate heptahydrate (KH_2PO_4) ยี่ห้อ CARLO ERBA Reagents ประเทศอิตาลี
- 3.2.22 Potassium sodium (+)- tartrate ($KNaC_4H_4O_6 \cdot 4H_2O$) ยี่ห้อ Univar reagent ประเทศออสเตรเลีย
- 3.2.23 Sodium hydroxide (NaOH) ยี่ห้อ Univar reagent ประเทศออสเตรเลีย
- 3.2.24 Sucrose ($C_{12}H_{22}O_{11}$) ยี่ห้อ Univar reagent ประเทศออสเตรเลีย
- 3.2.25 Sulfuric acid (H_2SO_4) ยี่ห้อ Univar reagent ประเทศออสเตรเลีย
- 3.2.26 Xylose ($C_5H_{10}O_5$) ยี่ห้อ Huakang ประเทศจีน
- 3.2.27 Yeast extract ยี่ห้อ Scharlau Microbiology ประเทศอังกฤษ
- 3.2.28 กากน้ำตาลอ้อย ยี่ห้อลิน โรงงานน้ำตาลพิษณุโลก ประเทศไทย
- 3.2.29 ถ่านกัมมันต์ (Activated carbon) ยี่ห้อ VWR chemicals ประเทศเบลเยียม

3.3. ขั้นตอนดำเนินงาน

3.3.1 แบคทีเรียที่ใช้ศึกษา

แบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษา คือ แบคทีเรีย *Acetobacter* sp. BX2 ซึ่งคัดแยกได้จากลำไยโดย ปรภัสสร และสุพรรณิภา (2557)

3.3.2 การกระตุ้นเชื้อและการเตรียมหัวเชื้อ

3.3.2.1 ทำการกระตุ้นเชื้อโดยนำเชื้อ *Acetobacter* sp. BX2 ที่เก็บรักษาไว้ในกลีเซอรอล อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส มาถ่ายลงในอาหาร selective medium (ภาคผนวก ก.1.2) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่สภาวะเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 25 ชั่วโมง และสังเกตปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตที่ลดลง เมื่อเทียบกับขวดอาหารควบคุมที่ไม่ได้ถ่ายเชื้อลงไป

3.3.2.2 เตรียมหัวเชื้อโดยนำเชื้อที่กระตุ้นจากข้อ 3.3.2.1 ร้อยละ 10 โดยปริมาตร มาถ่ายลงในอาหาร selective medium (ภาคผนวก ก.1.2) ปริมาตร 60 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่สภาวะเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาค้นคว้าเท่านั้น เมื่อผู้ใดเห็นนำไปใช้ประโยชน์ในการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

25 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวัดค่าความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ให้ได้ค่าดูดกลืนแสง อยู่ในช่วง 1.380-1.605 ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

3.3.3 การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบของกากน้ำตาลอ้อย

ทำการวิเคราะห์กากน้ำตาลอ้อย โดยทำการเจือจางกากน้ำตาลอ้อยด้วยน้ำปราศจากไอออน ให้มีความเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตร จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography ; HPLC) (HITACHI, Japan) ใช้คอลัมน์วิเคราะห์ ชนิด BP-800 Ca++ Carbohydrate (Benson polymeric, USA) ขนาดคอลัมน์ 7.8×300 มิลลิเมตร โดยใช้ น้ำที่ปราศจากไอออนเป็นเฟสเคลื่อนที่ อัตราการไหล 0.4 มิลลิลิตรต่อ นาที ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ทำการวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบในกากน้ำตาลอ้อย โดยการเทียบกับน้ำตาลมาตรฐาน 10 ชนิด ได้แก่ น้ำตาลซูโครส มอลโตส แล็กโตส กลูโคส ซาโลส กาแลคโตส แรมโนส แมนโนส ฟรุคโตส และอะราบิโนส

3.3.4 วิธีการปรับสภาพกากน้ำตาลอ้อย

3.3.4.1 การปรับสภาพกากน้ำตาลอ้อยด้วยกรดซัลฟูริก

นำกากน้ำตาลอ้อยมาทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 2 : 1 เติมกรดซัลฟูริก ความเข้มข้น 3 โมลาร์ เพื่อปรับพีเอชให้เท่ากับ 2.0 จากนั้นนำไปต้มในอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 10 โมลาร์ เพื่อปรับพีเอชให้มีค่าเท่ากับ 6.5 แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที เพื่อแยกตะกอนโลหะหนักออก (Xu และคณะ, 2015) จากนั้นเก็บส่วนใสที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Acetobacter sp.* BX2 เพื่อผลิตกรดมาลิกต่อไป

3.3.4.2 การปรับสภาพกากน้ำตาลอ้อยด้วยถ่านกัมมันต์

นำกากน้ำตาลอ้อยมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 2 : 1 เติมถ่านกัมมันต์ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายร้อยละ 5 โดยมวลต่อปริมาตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 7,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 40 นาที จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 10 โมลาร์ เพื่อปรับพีเอชให้มีค่าเท่ากับ 6.5 แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที เพื่อแยกตะกอนโลหะหนักออก (Xu และคณะ, 2015) จากนั้นเก็บส่วนใสที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Acetobacter sp.* BX2 เพื่อผลิตกรดมาลิกต่อไป

3.3.4.3 การปรับสภาพกากน้ำตาลอ้อยด้วยแคลเซียมไฮดรอกไซด์

นำกากน้ำตาลอ้อยมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 2 : 1 เติมแคลเซียมไฮดรอกไซด์ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายร้อยละ 15 โดยมวลต่อปริมาตร นำไปต้มที่อ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 98

องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 7,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 40 นาที จากนั้นปรับพีเอชให้เท่ากับ 6.5 โดยการเติมสารละลายกรดซัลฟูริก ไม่วางกรรมใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมีเหตุดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความเข้มข้น 3 โมลาร์ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที (Xu และคณะ, 2015) เพื่อแยกตะกอนโลหะหนักออก จากนั้นเก็บส่วนใสที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Acetobacter* sp. BX2 เพื่อผลิตกรดมาลิกต่อไป

3.3.4.4 การปรับสภาพกากน้ำตาลอ้อยด้วยโพแทสเซียมเพอร์โรไซยาไนด์

นำกากน้ำตาลอ้อยเจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 2 : 1 เติมโพแทสเซียมเพอร์โรไซยาไนด์ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายร้อยละ 0.3 โดยมวลต่อปริมาตร นำไปต้มในอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 96 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 10 โมลาร์ เพื่อปรับพีเอชให้มีค่าเท่ากับ 6.5 แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที เพื่อแยกตะกอนโลหะหนักออก (Xu และคณะ, 2015) จากนั้นเก็บส่วนใสที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Acetobacter* sp. BX2 เพื่อผลิตกรดมาลิกต่อไป

3.3.4.5 การปรับสภาพกากน้ำตาลอ้อยด้วยกรดซัลฟูริกและแคลเซียมไฮดรอกไซด์

นำกากน้ำตาลอ้อยมาทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 2 : 1 และปรับพีเอชเป็น 3.0 ด้วยกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 3 โมลาร์ จากนั้นนำกากน้ำตาลอ้อยไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นแล้วนำไปบ่มข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 7,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 40 นาที เพื่อแยกส่วนที่ไม่ละลายน้ำออก จากนั้นนำส่วนใสที่ได้ไปปรับพีเอชเป็น 6.0 ด้วยสารละลายแคลเซียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 10 โมลาร์ จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็วรอบ 7,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 40 นาที เพื่อแยกส่วนที่ไม่ละลายน้ำออก จากนั้นเก็บส่วนใสที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Acetobacter* sp. BX2 เพื่อผลิตกรดมาลิกต่อไป (Cheng และคณะ, 2017)

3.3.5 การศึกษาผลของการใช้น้ำตาลกลูโคส ฟรุคโตส และซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตแคลเซียมมาเลตโดย *Acetobacter* sp. BX2

จากการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบของกากน้ำตาลอ้อย ที่ศูนย์เครื่องมือคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง พบว่ากากน้ำตาลอ้อย ยี่ห้อลิน บริษัท น้ำตาลไทยรุ่งเรือง จำกัด จังหวัดพิษณุโลก ประเทศไทย มีน้ำตาลอย่างน้อย 3 ชนิด ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส ฟรุคโตส และซูโครส ปริมาณ 78.31 131.48 และ 296.21 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เป็นองค์ประกอบ (ภาคผนวก ค.1) จึงได้ศึกษาผลของการใช้น้ำตาลกลูโคส ฟรุคโตส และซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตแคลเซียมมาเลตโดย *Acetobacter* sp. BX2 โดยเพาะเลี้ยงในอาหาร calcium malate production (ภาคผนวก ก.1.3) ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ใน

ขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร โดยใช้กากน้ำตาลข้างต้นที่ความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ใช้หัวเชื้อจากข้อ 3.3.2.2 ร้อยละ 10 โดยปริมาตร ถ่ายลงในอาหารแต่ละขวดรูปชมพู่และไม่วารณใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมีเหตุดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทำการทดลองทั้งหมด 6 ซ้ำ นำไปบ่มที่สภาวะเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน และทำการเก็บตัวอย่างน้ำหมักทุกวัน โดยเก็บตัวอย่างปริมาตร 400 ไมโครลิตรต่อขวดรูปชมพู่ต่อแหล่งคาร์บอนต่อวัน และนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จากนั้นนำตัวอย่างน้ำหมักของแต่ละวันมาทำการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาล โดยในอาหารที่ใช้น้ำตาล กลูโคสและฟรุกโตสเป็นแหล่งคาร์บอน ทำการวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธีดีเอ็นเอส (Miller, 1959) แต่อาหารที่ใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนทำการวัดปริมาณน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธีฟินอล ซัลฟูริก (Dubosi และคณะ, 1956) และตกตะกอนแคลเซียมมาเลตทุกวันด้วยเมทานอล (Wang และคณะ, 2013) แล้วนำไปวิเคราะห์ปริมาณแคลเซียมมาเลตด้วยวิธีการไทเทรตต่อไป (FAO, 2006)

3.3.6 การศึกษาผลของการใช้กากน้ำตาลที่ปรับสภาพด้วยวิธีต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตแคลเซียมมาเลตโดย *Acetobacter* sp. BX2

ทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Acetobacter* sp. BX2 ในอาหาร calcium malate production (ภาคผนวก ก.1.3) ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร และใช้กากน้ำตาลอ้อยที่ไม่ปรับสภาพ และกากน้ำตาลอ้อยที่ปรับสภาพในข้อ 3.3.3 ทั้ง 5 วิธี ได้แก่ การปรับสภาพกากน้ำตาลอ้อยด้วยกรดซัลฟูริก การปรับสภาพกากน้ำตาลอ้อยด้วยถ่านกัมมันต์ การปรับสภาพกากน้ำตาลอ้อยด้วยแคลเซียมไฮดรอกไซด์ การปรับสภาพกากน้ำตาลอ้อยด้วยโพแทสเซียมเพอร์โรซายาไนต์ และการปรับสภาพกากน้ำตาลอ้อยด้วยกรดซัลฟูริกและแคลเซียมไฮดรอกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอน โดยทำการปรับความเข้มข้นของกากน้ำตาลอ้อยให้มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร โดยใช้หัวเชื้อจากข้อ 3.3.2.2 ร้อยละ 10 โดยปริมาตร ฉายลงในอาหารแต่ละขวดรูปชมพู่ และทำการทดลองทั้งหมด 6 ซ้ำ นำไปบ่มที่สภาวะเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 วัน และทำการเก็บตัวอย่างน้ำหมักทุกวัน โดยเก็บตัวอย่างปริมาตร 400 ไมโครลิตรต่อขวดรูปชมพู่ต่อแหล่งคาร์บอนต่อวัน และนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จากนั้นนำตัวอย่างน้ำหมักของแต่ละวันทำการวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธีดีเอ็นเอส (Miller, 1959) และตกตะกอนแคลเซียมมาเลตทุกวันด้วยเมทานอล (Wang และคณะ, 2013) แล้วนำไปวิเคราะห์ปริมาณแคลเซียมมาเลตด้วยวิธีการไทเทรตต่อไป (FAO, 2006)

3.3.7 การศึกษาผลของการใช้กากน้ำตาลอ้อยที่ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกและแคลเซียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตแคลเซียมมาเลตโดย *Acetobacter* sp. BX2

จากการศึกษาผลของการใช้กากน้ำตาลอ้อยที่ปรับสภาพด้วยวิธีต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตแคลเซียมมาเลตโดย *Acetobacter* sp. BX2 พบว่าเมื่อใช้กากน้ำตาลอ้อยที่ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกและแคลเซียมไฮดรอกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอนโดย *Acetobacter* sp. BX2 สามารถผลิตแคลเซียมมาเลตได้ปริมาณที่สูงที่สุด จึงนำกากน้ำตาลอ้อยที่ปรับสภาพด้วยวิธีดังกล่าว มาศึกษาผลของ

ความเข้มข้นของกากน้ำตาลอ้อยโดยเพาะเลี้ยงในอาหาร calcium malate production (ภาคผนวก ก.1.3) ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร และปรับความเข้มข้นของ
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่ขึ้นด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กากน้ำตาลอ้อย ได้แก่ 50, 100, 150 และ 200 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยใช้หัวเชื้อจากข้อ 3.3.2.2 ร้อยละ 10 โดยปริมาตร ถ่ายลงในอาหารแต่ละขวดรูปชมพู่และทำการทดลองทั้งหมด 6 ซ้ำ นำไปบ่มที่สภาวะเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน และทำการเก็บตัวอย่างน้ำหมักทุกวัน โดยเก็บตัวอย่างปริมาตร 400 ไมโครลิตรต่อขวดรูปชมพู่ต่อความเข้มข้นต่อวัน และนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จากนั้นนำตัวอย่างน้ำหมักของแต่ละวันมาทำการวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธีดีเอ็นเอส (Miller, 1959) และตกตะกอนแคลเซียมมาเลตทุกวันด้วยเมทานอล (Wang และคณะ, 2013) แล้วนำไปวิเคราะห์ปริมาณแคลเซียมมาเลตด้วยวิธีการไทเทรตต่อไป (FAO, 2006)

3.3.8 การศึกษาผลของการใช้แหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้นแตกต่างกันในการผลิตแคลเซียมมาเลตโดย *Acetobacter* sp. BX2

จากการศึกษาผลของการใช้กากน้ำตาลอ้อยที่ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกและแคลเซียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตแคลเซียมมาเลตโดย *Acetobacter* sp. BX2 พบว่า เมื่อใช้กากน้ำตาลอ้อยความเข้มข้น 200 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน *Acetobacter* sp. BX2 สามารถผลิตแคลเซียมมาเลตได้ปริมาณที่สูงที่สุด จึงนำวิธีการปรับสภาพกากน้ำตาลอ้อยที่ความเข้มข้นดังกล่าวมาใช้ในการศึกษาผลของความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนโดยเฉพาะเลี้ยง *Acetobacter* sp. BX2 ในอาหาร calcium malate production (ภาคผนวก ก.1.3) ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร และปรับความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน ได้แก่ ร้อยละ 0, 0.25, 0.5, 0.75 และ 1 โดยปริมาตร ตามลำดับ โดยใช้หัวเชื้อจากข้อ 3.3.2.2 ร้อยละ 10 โดยปริมาตร ถ่ายลงในอาหารแต่ละขวดรูปชมพู่และทำการทดลองทั้งหมด 6 ซ้ำ นำไปบ่มที่สภาวะเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 วัน และทำการเก็บตัวอย่างน้ำหมักทุกวัน โดยเก็บตัวอย่างปริมาตร 400 ไมโครลิตรต่อขวดรูปชมพู่ต่อความเข้มข้นต่อวัน และนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จากนั้นนำตัวอย่างน้ำหมักของแต่ละวันทำการวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธีดีเอ็นเอส (Miller, 1959) และตกตะกอนแคลเซียมมาเลตทุกวันด้วยเมทานอล (Wang และคณะ, 2013) แล้วนำไปวิเคราะห์ปริมาณแคลเซียมมาเลตด้วยวิธีการไทเทรตต่อไป (FAO, 2006)

3.3.9 การศึกษาการผลิตและอัตราการผลิตแคลเซียมมาเลตโดย *Acetobacter* sp. BX2 เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหาร calcium malate production ที่มีกากน้ำตาลอ้อยที่ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกและแคลเซียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 200 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และมี corn steep liquor ความเข้มข้นร้อยละ 0.25 โดยปริมาตร เป็นแหล่งไนโตรเจน

จากการศึกษาผลของการใช้กากน้ำตาลอ้อยที่ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกและแคลเซียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันเป็นแหล่งคาร์บอน และการศึกษาผลของการใช้แหล่งไนโตรเจนที่

ความเข้มข้นแตกต่างกันในการผลิตแคลเซียมมาเลตโดย *Acetobacter* sp. BX2 พบว่าในอาหารที่มี
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่ขึ้นต้นการค้า
กากน้ำตาลอ้อยปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกและแคลเซียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 200 กรัมต่อลิตร
ไม่วารณใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมีเหตุดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็นแหล่งคาร์บอน และมี corn steep liquor ความเข้มข้นร้อยละ 0.25 โดยปริมาตร เป็นแหล่งไนโตรเจน *Acetobacter* sp. BX2 สามารถผลิตแคลเซียมมาเลตได้ปริมาณที่สูงที่สุด จึงนำสภาวะดังกล่าวมาศึกษาการผลิตและอัตราการผลิตแคลเซียมมาเลตโดย *Acetobacter* sp. BX2 เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหาร calcium malate production ที่มีกากน้ำตาลอ้อยที่ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริก และแคลเซียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 200 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และมี corn steep liquor ความเข้มข้นร้อยละ 0.25 โดยปริมาตร เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยเพาะเลี้ยงในอาหาร calcium malate production (ภาคผนวก ก.1.3) ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร โดยใช้หัวเชื้อจากข้อ 3.3.2.2 ร้อยละ 10 โดยปริมาตร ถ่ายลงในอาหารแต่ละขวดรูปชมพู่และทำการทดลองทั้งหมด 6 ซ้ำ นำไปบ่มที่สภาวะเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน และทำการเก็บตัวอย่างน้ำหมักทุกวัน โดยเก็บตัวอย่างปริมาตร 400 ไมโครลิตรต่อขวดรูปชมพู่ต่อวัน และนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จากนั้นนำตัวอย่างน้ำหมักของแต่ละวันมาทำการวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธีดีเอ็นเอส (Miller, 1959) และตกตะกอนแคลเซียมมาเลตทุกวันด้วยเมทานอล (Wang และคณะ, 2013) แล้วนำไปวิเคราะห์ปริมาณแคลเซียมมาเลตด้วยวิธีการไทเทรตต่อไป (FAO, 2006)

3.3.10 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธีดีเอ็นเอส

นำตัวอย่างน้ำหมักที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส มาตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 9,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกแคลเซียมคาร์บอเนตและตะกอนเซลล์ออก จากนั้นนำส่วนใสไปทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่น แล้วนำตัวอย่างปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร มาเติมสารละลายดีเอ็นเอสปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ในตู้ดูดควัน แล้วผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสารละลาย จากนั้นนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที เมื่อครบเวลาแล้วให้รีบนำมาทำให้เย็นทันที จากนั้นเติมน้ำกลั่นปริมาตร 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสารละลาย นำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร (Miller, 1959) โดยทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ และใช้สารละลายน้ำตาลกลูโคส เป็นสารละลายมาตรฐาน (ภาคผนวก ข.1)

3.3.11 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธีฟินอลซัลฟูริก

นำตัวอย่างน้ำหมักที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส มาตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 9,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกแคลเซียมคาร์บอเนตและตะกอนเซลล์ออก จากนั้นนำส่วนใสไปทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่น แล้วนำตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาเติมสารละลายฟินอลความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และตั้งทิ้งไว้ 10 นาที ในตู้ดูดควัน จากนั้นนำสารละลายที่ได้มาผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสารละลาย และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร (Dubosi และ

คณะ, 1956) โดยทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ และใช้สารละลายน้ำตาลกลูโคสเป็นสารละลายมาตรฐาน (ภาคผนวก ข.2)

ไม่วารณใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งยังมีให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.12 การวิเคราะห์ปริมาณกรดมาลิก

3.3.12.1 การตกตะกอนแคลเซียมมาเลต

นำตัวอย่างน้ำหมักไปทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เพื่อแยกแคลเซียมคาร์บอเนตและตะกอนเซลล์ออก จากนั้นนำส่วนใสปริมาตร 30 มิลลิลิตร เติมเมทานอลปริมาตร 15 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ซึ่งในขั้นตอนนี้เป็นกรังกำจัดเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ (exopolysacchrides) จากนั้นนำส่วนใสเติมลงไปเมทานอลอีกครั้งปริมาตร 90 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ซ้ำมคืน แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสที่เป็นเมทานอลทิ้ง แล้วนำตะกอนไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส จนตะกอนแห้งแล้วนำไปทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น ซึ่งจะได้ผลึกของแคลเซียมมาเลต (Wang และคณะ, 2013) และนำไปชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง

3.3.12.2 การวิเคราะห์ปริมาณแคลเซียมมาเลตด้วยวิธีการไทเทรต

ชั่งน้ำหนักตะกอนแคลเซียมมาเลตจากข้อ 3.3.12 ให้ได้ปริมาณ 0.2xxx กรัม ด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง นำมาละลายด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นเติมกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 0.27 โมลาร์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ทำการปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายไฮดรอกซีเบนทอลบูลความเข้มข้นร้อยละ 0.3 โดยมวลต่อปริมาตร (อินดิเคเตอร์) 2-3 หยด แล้วทำการไทเทรตกับสารละลาย EDTA ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ (FAO, 2006) จากนั้นคำนวณหาปริมาณแคลเซียมมาเลต

จากสูตร

$$\frac{\text{น้ำหนักตะกอนทั้งหมด (กรัม)} \times \text{ปริมาณ EDTA ที่ใช้ไทเทรต (มิลลิลิตร)} \times 8.607 \text{ มิลลิกกรัม}}{\text{น้ำหนักตะกอนที่ใช้ไทเทรต (กรัม)}}$$

โดย EDTA เข้มข้น 0.05 โมลาร์ 1 มิลลิลิตร จะเท่ากับแคลเซียมมาเลต 8.607 มิลลิกกรัม

3.3.13 การวิเคราะห์เพื่อเปรียบเทียบค่าทางสถิติด้วยโปรแกรม Minitab 18

วิเคราะห์ค่าทางสถิติด้วยโปรแกรม minitab 18 โดยทำการวิเคราะห์แบบ One-way anova ตามวิธีของ Duncan ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 (Rios, 2009)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 ผลของการใช้น้ำตาลกลูโคส ฟรุคโตส และซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิต แคลเซียมมาเลตโดย *Acetobacter* sp. BX2

ทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Acetobacter* sp. BX2 ในอาหาร calcium malate production (ภาคผนวก ก.1.3) ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร โดยใช้ น้ำตาลกลูโคส ฟรุคโตส และซูโครส ซึ่งเป็นน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบในกากน้ำตาลอ้อยเป็นแหล่ง คาร์บอน โดยใช้ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร ถ่ายเชื้อร้อยละ 10 โดยปริมาตร ลงในอาหาร (ภาคผนวก ก.1.3) นำไปหมักที่สภาวะเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นนำตัวอย่างน้ำหมักของแต่ละวันมาทำการวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี ดีเอ็นเอส (Miller, 1959) กรณีที่ใช้น้ำตาลกลูโคสและฟรุคโตสเป็นแหล่งคาร์บอน สำหรับอาหารที่ใช้ น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนทำการวัดปริมาณน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธีฟินอลซัลฟูริก (Dubosi และ คณะ, 1956) การวิเคราะห์กรดมาลิกโดยวิธีการตกตะกอนและการไทเทรตแคลเซียมมาเลต (Wang และคณะ, 2013; FAO, 2006) เนื่องจากอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงมีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนต เป็นตัวควบคุมพีเอช โดยแคลเซียมมาเลตเกิดจากแคลเซียมคาร์บอเนตนั้นจะแยกออกเป็น คาร์บอนไดออกไซด์และแคลเซียม และคาร์บอนไดออกไซด์จะเข้าสู่วิถีวัฏจักรที่ไฟไตรคาร์บอกซิลิก (reductive tricarboxylic acid) ที่บริเวณไซโตซอลของเซลล์ ส่วนแคลเซียมที่เป็นส่วนเกินอยู่นอก เซลล์จะจับกับกรดมาลิก แล้วฟอร์มตัวอยู่ในรูปแคลเซียมมาเลต (Khan และคณะ, 2014) และได้ผล การทดลองดังตารางที่ 4.1 และรูปที่ 4.1

จากตารางที่ 4.1 เมื่อทำการเพาะเลี้ยง *Acetobacter* sp. BX2 ในอาหาร calcium malate production โดยใช้น้ำตาลกลูโคส ฟรุคโตส และซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเมื่อใช้น้ำตาลกลูโคส เป็นแหล่งคาร์บอน สามารถผลิตแคลเซียมมาเลตสูงสุดเท่ากับ 34.87 ± 0.19 กรัมต่อลิตร และมีผลได้ และอัตราการผลิตสูงสุด 0.42 ± 0.15 กรัมต่อกรัมน้ำตาล และ 0.003 ± 0.00 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ปริมาณน้ำตาลกลูโคสลดลง อย่างเห็นได้ชัดในช่วงวันที่ 1 และวันที่ 2 โดยลดลงจากปริมาณน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นซึ่งเท่ากับ 84.63 ± 0.45 กรัมต่อลิตร ลดลงเหลือ 31.46 ± 0.14 และ 1.43 ± 0.06 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และใน วันที่ 3 ถึงวันที่ 4 ปริมาณน้ำตาลกลูโคสเริ่มคงที่เหลือ 1.05 ± 0.04 และ 1.04 ± 0.04 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือในวันที่ 5 เท่ากับ 0.87 ± 0.09 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการ เพาะเลี้ยง *Acetobacter* sp. BX2 เป็นเวลา 5 วัน ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ถูกใช้เท่ากับ 83.75 กรัม ต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 98.97 (รูปที่ 4.1)

เมื่อใช้น้ำตาลฟรุคโตสเป็นแหล่งคาร์บอน สามารถผลิตแคลเซียมมาเลต ผลได้ และอัตราการ ผลิตเท่ากับ 2.49 ± 0.31 กรัมต่อลิตร 0.22 ± 0.06 กรัมต่อกรัมน้ำตาล และ 0.002 ± 0.00 กรัมต่อ ลิตรต่อชั่วโมง ทุกสัปดาห์ ทั้งนี้ อีกรหัสงานมีเหตุผลเปลี่ยนแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณน้ำตาลฟรุกโตสลดลงเพียงเล็กน้อยในวันที่ 1, 2, 3 และ 4 โดยลดลงจากปริมาณน้ำตาลฟรุกโตสเริ่มต้นซึ่ง เท่ากับ 72.79 ± 0.75 ลดลงเหลือ 68.54 ± 0.79 65.58 ± 0.51 64.58 ± 0.38 และ 62.96 ± 0.47 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และปริมาณน้ำตาลฟรุกโตสที่เหลือในวันที่ 5 เท่ากับ 61.33 ± 0.72 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการเพาะเลี้ยง *Acetobacter* sp. BX2 เป็นเวลา 5 วัน ปริมาณน้ำตาลฟรุกโตสที่ถูกใช้เท่ากับ 11.46 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 15.74 (รูปที่ 4.1)

เมื่อใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน สามารถผลิตแคลเซียมมาเลต ผลได้ และอัตราการผลิตเท่ากับ 3.54 ± 0.23 กรัมต่อลิตร 0.16 ± 0.06 กรัมต่อกรัมน้ำตาล และ 0.001 ± 0.00 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ นอกจากนี้พบว่าปริมาณน้ำตาลซูโครสลดลงเพียงเล็กน้อยอย่างต่อเนื่องในวันที่ 1 2 3 และ 4 โดยลดลงจากปริมาณน้ำตาลซูโครสเริ่มต้นซึ่งเท่ากับ 92.77 ± 1.22 กรัมต่อลิตร ลดลงเหลือ 91.23 ± 1.48 86.36 ± 2.35 80.87 ± 1.84 และ 73.28 ± 3.01 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และปริมาณน้ำตาลซูโครสที่เหลือในวันที่ 5 เท่ากับ 70.15 ± 3.54 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการเพาะเลี้ยง *Acetobacter* sp. BX2 เป็นเวลา 5 วัน ปริมาณน้ำตาลซูโครสที่ถูกใช้เท่ากับ 22.62 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 24.38 (รูปที่ 4.1)

เมื่อเปรียบเทียบการใช้น้ำตาลที่แตกต่างกันเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตแคลเซียมมาเลต โดยเชื้อ *Acetobacter* sp. BX2 พบว่า *Acetobacter* sp. BX2 สามารถใช้น้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบของกากน้ำตาลอ้อยได้ทุกชนิด โดยแบ่งการใช้น้ำตาลเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มแรก น้ำตาลกลูโคส การใช้น้ำตาลในวันที่ 1 และวันที่ 2 ปริมาณน้ำตาลกลูโคสลดลงรวดเร็วอย่างเห็นได้ชัด หลังจากนั้นวันที่ 3, 4 และ 5 ปริมาณน้ำตาลเริ่มลดลงคงที่ และกลุ่มที่สอง น้ำตาลฟรุกโตสและซูโครส การใช้น้ำตาลฟรุกโตสและซูโครส ลดลงเพียงเล็กน้อยตั้งแต่วันที่ 1 2 3 4 และ 5 (รูปที่ 4.1)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 แสดงผลของการใช้น้ำตาลกลูโคส ฟรุคโตส และซูโครส เป็นแหล่งคาร์บอน ต่อปริมาณแคลเซียมมาเลต ผลได้ และอัตราการผลิตของเชื้อ *Acetobacter* sp. BX2

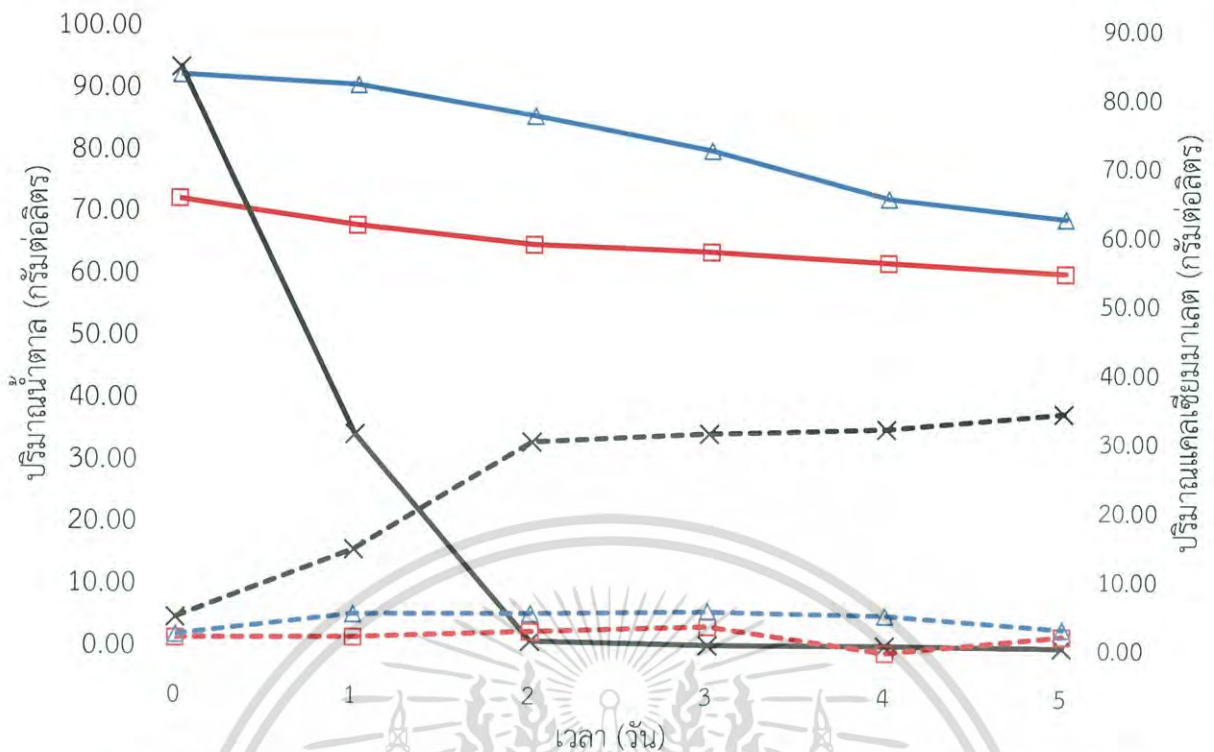
แหล่งคาร์บอน	ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	แคลเซียมมาเลต (กรัมต่อลิตร)	ผลได้ (กรัมต่อกรัมน้ำตาล)	อัตราการผลิต (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)
น้ำตาลกลูโคส	84.63 ± 0.45	0.87 ± 0.09	34.87 ^a ± 0.19	0.42 ^a ± 0.15	0.003 ^a ± 0.00
น้ำตาลฟรุคโตส	72.79 ± 0.75	61.33 ± 0.72	2.49 ^b ± 0.31	0.22 ^a ± 0.06	0.002 ^a ± 0.00
น้ำตาลซูโครส	92.77 ± 1.22	70.15 ± 3.54	3.54 ^b ± 0.23	0.16 ^a ± 0.06	0.001 ^a ± 0.00

หมายเหตุ

ค่าที่รายงานทั้งหมดคือค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการทดลอง ค่าที่ทำเครื่องหมายด้วยตัวอักษรเดียวกันในคอลัมน์นี้ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ในขณะที่ตัวอักษรที่ต่างกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณแคลเซียมมาเลต เมื่อใช้น้ำตาลกลูโคส ฟรุคโตส และซูโครส เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า *Acetobacter* sp. BX2 สามารถใช้น้ำตาลได้ทั้ง 3 ชนิด โดยใช้น้ำตาลกลูโคสได้เร็วที่สุด รองลงมา คือ น้ำตาลซูโครสและฟรุคโตส ตามลำดับ ซึ่งสามารถผลิตแคลเซียมมาเลตได้ 34.87 ± 0.19 3.54 ± 0.23 และ 2.49 ± 0.31 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 4.1) จากการวิเคราะห์ค่าทางสถิติโดยใช้โปรแกรม minitab 18 แบบ One-way anova ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 (Rios, 2009) พบว่าเมื่อใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนสามารถผลิตแคลเซียมมาเลตได้สูงที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณน้ำตาลที่ถูกใช้ เนื่องจากน้ำตาลกลูโคสเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่จุลินทรีย์นำไปใช้ได้ง่ายและเร็ว สามารถสลายได้โดยตรงเพื่อให้พลังงานและคาร์บอนสำหรับการสังเคราะห์ทางชีวภาพ โดยน้ำตาลกลูโคสจะเข้าสู่วิถีไกลโคไลซิส ซึ่งวิธีนี้จะเป็นการสลายน้ำตาลกลูโคสได้ไพรูเวทแล้วเข้าสู่เมแทบอลิซึมการผลิตกรดมาลิกต่อไป นอกจากนี้การใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนยังส่งเสริมการผลิตแคลเซียมมาเลตได้ดี (Knuf, 2013; Zhang และคณะ, 2011) แต่การใช้ น้ำตาลซูโครสและฟรุคโตสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า *Acetobacter* sp. BX2 สามารถใช้น้ำตาลซูโครสได้เร็วกว่าการใช้น้ำตาลฟรุคโตส เนื่องจากน้ำตาลซูโครสเป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่ โดยน้ำตาลซูโครสเมื่อย่อยสลายเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวจะได้น้ำตาลกลูโคสและฟรุคโตส โดยน้ำตาลกลูโคสสามารถเข้าสู่วิถีไกลโคไลซิสได้โดยตรงแล้วเข้าสู่เมแทบอลิซึมการผลิตกรดมาลิก แต่น้ำตาลฟรุคโตสจะต้องถูกเปลี่ยนเป็นฟรุคโตส-6-ฟอสเฟต (fructose-6-phosphate) โดยเอนไซม์เฮกโซไคเนส (Hexokinase) จากนั้นน้ำตาลฟรุคโตสจะเข้าสู่วิถีไกลโคไลซิสแล้วเข้าสู่เมแทบอลิซึมการผลิตกรดมาลิกต่อไป โดยเมแทบอลิซึมการผลิตกรดมาลิก ได้แก่ Direct reduction of oxaloacetate วัฏจักรกรดไตรคาร์บอกซิลิก วัฏจักรไกลออกซีเลต และวัฏจักรไกลออกซีเลตแบบไม่เต็มวง ทั้งนี้การเข้าสู่เมแทบอลิซึมการผลิตกรดมาลิกขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ที่สามารถนำไปใช้ในการผลิตกรดมาลิก (Magnuson และ Lasure, 2004; Zelle และคณะ, 2008) ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับปริมาณแคลเซียมมาเลตและการใช้น้ำตาลซูโครสและฟรุคโตสที่สามารถใช้น้ำตาลซูโครสได้ดีกว่าการใช้น้ำตาลฟรุคโตส นอกจากนี้ Cheng และคณะ (2017) ได้ทำการศึกษาการผลิตกรดมาลิกโดย *Aurebasidium pullulans* พบว่าการใช้น้ำตาลกลูโคส ซูโครส และฟรุคโตส ความเข้มข้น 90 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน สามารถผลิตกรดมาลิกได้ 54.9 ± 2.3 54.5 ± 1.6 และ 43.2 ± 1.2 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าเมื่อใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนสามารถผลิตแคลเซียมมาเลตได้สูงสุด รองลงมาคือการใช้ น้ำตาลซูโครสและฟรุคโตสเป็นแหล่งคาร์บอน ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.1 กราฟแสดงปริมาณน้ำตาล (—) และปริมาณแคลเซียมมาเลต (----) เมื่อทำการเพาะเลี้ยง *Acetobacter* sp. BX2 ในอาหาร calcium malate production ที่มีน้ำตาลกลูโคส (x) น้ำตาลฟรุกโตส (□) และน้ำตาลซูโครส (△) เป็นแหล่งคาร์บอน ตามลำดับ

4.2 ผลของการใช้กากน้ำตาลอ้อยที่ปรับสภาพด้วยวิธีต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตแคลเซียมมาเลตโดย *Acetobacter* sp. BX2

ทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Acetobacter* sp. BX2 ในอาหาร calcium malate production (ภาคผนวก ก.1.3) ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร และใช้กากน้ำตาลอ้อยที่ไม่ปรับสภาพและกากน้ำตาลอ้อยที่ปรับสภาพในข้อ 3.3.3 ทั้ง 5 วิธี ได้แก่ การปรับสภาพกากน้ำตาลอ้อยด้วยกรดซัลฟูริก การปรับสภาพกากน้ำตาลอ้อยด้วยถ่านกัมมันต์ การปรับสภาพกากน้ำตาลอ้อยด้วยแคลเซียมไฮดรอกไซด์ การปรับสภาพกากน้ำตาลอ้อยด้วยโพแทสเซียมเพอร์โรซายาไนต์ และการปรับสภาพกากน้ำตาลอ้อยด้วยกรดซัลฟูริกและแคลเซียมไฮดรอกไซด์ เป็นแหล่งคาร์บอน โดยทำการปรับความเข้มข้นของกากน้ำตาลอ้อยให้มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร ถ่ายเชื้อร้อยละ 10 โดยปริมาตร ลงในอาหาร (ภาคผนวก ก.1.3) นำไปปั่นที่สภาวะเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 วัน จากนั้นนำตัวอย่างน้ำหมักของแต่ละวันไปทำการวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธีดีเอ็นเอส (Miller, 1959) และตกตะกอนแคลเซียมมาเลตด้วยเมทานอล (Wang และคณะ, 2013) แล้วนำไปวิเคราะห์ปริมาณแคลเซียมมาเลตด้วยวิธีการไทเทรต (FAO, 2006) ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 4.2 และรูปที่ 4.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากตารางที่ 4.2 เมื่อทำการเพาะเลี้ยง *Acetobacter* sp. BX2 ในอาหารเหลว calcium malate production โดยการใช้กากน้ำตาลอ้อยที่ไม่ปรับสภาพ และกากน้ำตาลอ้อยที่ปรับสภาพ ด้วยวิธีต่างๆ คือ ปรับสภาพกากน้ำตาลอ้อยด้วยกรดซัลฟูริก ปรับสภาพกากน้ำตาลอ้อยด้วยถ่าน กัมมันต์ ปรับสภาพกากน้ำตาลอ้อยด้วยแคลเซียมไฮดรอกไซด์ ปรับสภาพกากน้ำตาลอ้อยด้วย โปแทสเซียมเพอร์โรไซยาไนด์ และปรับสภาพกากน้ำตาลอ้อยด้วยกรดซัลฟูริกและแคลเซียมไฮดรอก- ไซด์ เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า เมื่อใช้กากน้ำตาลอ้อยที่ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกและแคลเซียมไฮ- ดรอกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอนสามารถผลิตแคลเซียมมาเลตได้สูงสุดเท่ากับ 24.20 ± 1.46 กรัมต่อลิตร ผลได้ 0.56 ± 0.03 กรัมต่อกรัมน้ำตาล และอัตราการผลิตสูงสุดเท่ากับ 0.14 ± 0.01 กรัมต่อลิตรต่อ ชั่วโมง นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงอย่างเห็นได้ชัดในช่วงวันที่ 1 2 3 และ 4 โดย ลดลงจากปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นซึ่งเท่ากับ 99.88 ± 0.12 กรัมต่อลิตร ลดลงเหลือ 92.08 ± 2.62 74.46 ± 1.71 71.58 ± 0.40 และ 63.13 ± 0.45 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ แต่ในวันที่ 5 ปริมาณ น้ำตาลรีดิวซ์ลดลงเพียงเล็กน้อยเหลือ 59.58 ± 1.75 กรัมต่อลิตร และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือใน วันที่ 6 เท่ากับ 56.50 ± 0.88 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการเพาะเลี้ยง *Acetobacter* sp. BX2 เป็นเวลา 6 วัน ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ถูกใช้เท่ากับ 43.38 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 43.43 (รูปที่ 4.2)

เมื่อทำการเพาะเลี้ยง *Acetobacter* sp. BX2 ในอาหารเหลว calcium malate production เป็นเวลา 6 วัน โดยการใช้กากน้ำตาลอ้อยที่ไม่ปรับสภาพเป็นแหล่งคาร์บอน สามารถ ผลิตแคลเซียมมาเลต ผลได้ และอัตราการผลิตเท่ากับ 20.34 ± 1.24 กรัมต่อลิตร 0.52 ± 0.03 กรัม ต่อกรัมน้ำตาล และ 0.12 ± 0.007 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณ น้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นซึ่ง เท่ากับ 78.79 ± 0.97 กรัมต่อลิตร และในวันที่ 1 มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ เท่ากับ 75.38 ± 1.21 กรัมต่อลิตร ซึ่งลดลงเพียงเล็กน้อย และเริ่มลดลงอย่างรวดเร็วในวันที่ 2 และ 3 โดยลดลงเหลือ 60.25 ± 2.13 และ 53.04 ± 1.28 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในวันที่ 4 ถึงวันที่ 5 ปริมาณน้ำตาลลดลงอย่างต่อเนื่องเหลือ 49.83 ± 0.79 และ 45.54 ± 0.51 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในวันที่ 6 เท่ากับ 39.38 ± 1.75 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการเพาะเลี้ยง *Acetobacter* sp. BX2 เป็นเวลา 6 วัน ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ถูกใช้เท่ากับ 39.42 กรัมต่อลิตร คิด เป็นร้อยละ 50.03 (รูปที่ 4.2)

เมื่อใช้กากน้ำตาลอ้อยที่ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกเป็นแหล่งคาร์บอน สามารถผลิต แคลเซียมมาเลต ผลได้ และอัตราการผลิตเท่ากับ 18.14 ± 0.72 กรัมต่อลิตร 0.49 ± 0.02 กรัมต่อ กรัมน้ำตาล และ 0.11 ± 0.004 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณน้ำตาล รีดิวซ์ลดลงอย่างเห็นได้ชัดในช่วงวันที่ 1 และวันที่ 2 โดยลดลงจากปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นซึ่ง เท่ากับ 87.79 ± 0.76 กรัมต่อลิตร ลดลงเหลือ 77.67 ± 2.21 และ 61.96 ± 0.83 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ แต่ในวันที่ 3 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงเพียงเล็กน้อยเหลือ 57.58 ± 0.80 กรัมต่อลิตร ใน วันที่ 4 ถึงวันที่ 5 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มคงที่เหลือ 54.92 ± 1.51 และ 52.21 ± 0.72 กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนำมาใช้เพื่อประโยชน์อื่นใดเป็นการค้า ไม่วารณใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เพาะเลี้ยง *Acetobacter* sp. BX2 เป็นเวลา 6 วัน ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ถูกใช้เท่ากับ 36.75 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 41.86 (รูปที่ 4.2)

เมื่อใช้กากน้ำตาลอ้อยที่ปรับสภาพด้วยถ่านกัมมันต์เป็นแหล่งคาร์บอน สามารถผลิตแคลเซียมมาเลต ผลได้ และอัตราการผลิตเท่ากับ 16.05 ± 0.79 กรัมต่อลิตร 0.41 ± 0.02 กรัมต่อกรัมน้ำตาล และ 0.10 ± 0.004 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงอย่างเห็นได้ชัดในช่วงวันที่ 1 และวันที่ 2 โดยลดลงจากปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นซึ่งเท่ากับ 92.54 ± 0.44 กรัมต่อลิตร ลดลงเหลือ 80.13 ± 1.35 และ 62.46 ± 2.01 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ แต่ในวันที่ 3 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงเพียงเล็กน้อยเหลือ 57.88 ± 0.33 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 4 ถึงวันที่ 5 ปริมาณน้ำตาลเริ่มคงที่เหลือ 57.33 ± 1.40 และ 53.21 ± 0.79 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือในวันที่ 6 เท่ากับ 53.08 ± 0.79 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการเพาะเลี้ยง *Acetobacter* sp. BX2 เป็นเวลา 6 วัน ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ถูกใช้เท่ากับ 39.46 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 42.79 (รูปที่ 4.2)

เมื่อใช้กากน้ำตาลอ้อยที่ปรับสภาพด้วยแคลเซียมไฮดรอกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอน สามารถผลิตแคลเซียมมาเลต ผลได้ และอัตราการผลิตเท่ากับ 18.42 ± 0.74 กรัมต่อลิตร 0.50 ± 0.02 กรัมต่อกรัมน้ำตาล และ 0.11 ± 0.004 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงอย่างต่อเนื่องในช่วงวันที่ 1 2 3 และ 4 โดยลดลงจากปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นซึ่งเท่ากับ 98.75 ± 0.33 กรัมต่อลิตร ลดลงเหลือ 90.17 ± 2.24 81.29 ± 2.72 77.42 ± 1.09 และ 70.54 ± 2.33 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ แต่ในวันที่ 5 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงเพียงเล็กน้อยเหลือ 68.79 ± 1.38 กรัมต่อลิตร และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือในวันที่ 6 เท่ากับ 61.83 ± 0.83 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการเพาะเลี้ยง *Acetobacter* sp. BX2 เป็นเวลา 6 วัน ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ถูกใช้เท่ากับ 36.92 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 37.79 (รูปที่ 4.2)

เมื่อใช้กากน้ำตาลอ้อยที่ปรับสภาพด้วยโพแทสเซียมเพอร์โรซายาไนต์เป็นแหล่งคาร์บอน สามารถผลิตแคลเซียมมาเลต ผลได้ และอัตราการผลิตเท่ากับ 15.54 ± 1.51 กรัมต่อลิตร 0.48 ± 0.05 กรัมต่อกรัมน้ำตาล และ 0.09 ± 0.01 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นซึ่งเท่ากับ 82.33 ± 0.52 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 1 ถึงวันที่ 2 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 81.83 ± 0.38 และ 78.92 ± 2.95 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งลดลงเพียงเล็กน้อยและเริ่มลดลงอย่างรวดเร็วในวันที่ 3 และ 4 โดยลดลงเหลือ 68.71 ± 3.59 และ 52.42 ± 0.80 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในวันที่ 5 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มคงที่เหลือ 52.38 ± 0.76 กรัมต่อลิตร และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือในวันที่ 6 เท่ากับ 50.25 ± 0.89 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการเพาะเลี้ยง *Acetobacter* sp. BX2 เป็นเวลา 6 วัน ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ถูกใช้เท่ากับ 32.08 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 38.96 (รูปที่ 4.2)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 แสดงปริมาณแคลเซียมมาเลต ผลได้ และอัตราการผลิตของเชื้อ *Acetobacter* sp. BX2 เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหารที่ใช้กากน้ำตาลอ้อยที่ปรับสภาพด้วยวิธีต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอน

วิธีการปรับสภาพ	ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	แคลเซียมมาเลต (กรัมต่อลิตร)	ผลได้ (กรัมต่อกรัมน้ำตาล)	อัตราการผลิต (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)
กากน้ำตาลไม่ปรับสภาพ	78.79 ± 0.97	39.38 ± 1.75	20.34 ^b ± 1.24	0.52 ^a ± 0.03	0.12 ^b ± 0.007
ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริก	87.79 ± 0.76	51.04 ± 0.95	18.14 ^{bc} ± 0.72	0.49 ^a ± 0.02	0.11 ^{bc} ± 0.004
ปรับสภาพด้วยถ่านกัมมันต์	92.54 ± 0.44	53.08 ± 0.79	16.05 ^c ± 0.79	0.41 ^b ± 0.02	0.10 ^c ± 0.004
ปรับสภาพด้วยแคลเซียมไฮดรอกไซด์	98.75 ± 0.33	61.83 ± 0.83	18.42 ^{bc} ± 0.74	0.50 ^a ± 0.02	0.11 ^{bc} ± 0.004
ปรับสภาพด้วยโพแทสเซียมเพอร์โซยานาइट	82.33 ± 0.52	50.25 ± 0.87	15.54 ^c ± 1.51	0.48 ^{ab} ± 0.05	0.09 ^c ± 0.01
ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกและแคลเซียมไฮดรอกไซด์	99.88 ± 0.12	56.50 ± 0.88	24.20 ^a ± 1.46	0.56 ^a ± 0.03	0.14 ^a ± 0.01

หมายเหตุ ค่าที่รายงานทั้งหมดคือค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการทดลอง ค่าที่ทำเครื่องหมายด้วยตัวอักษรเดียวกันในคอลัมน์นี้ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ในขณะที่เดียวกันตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมน์นี้มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

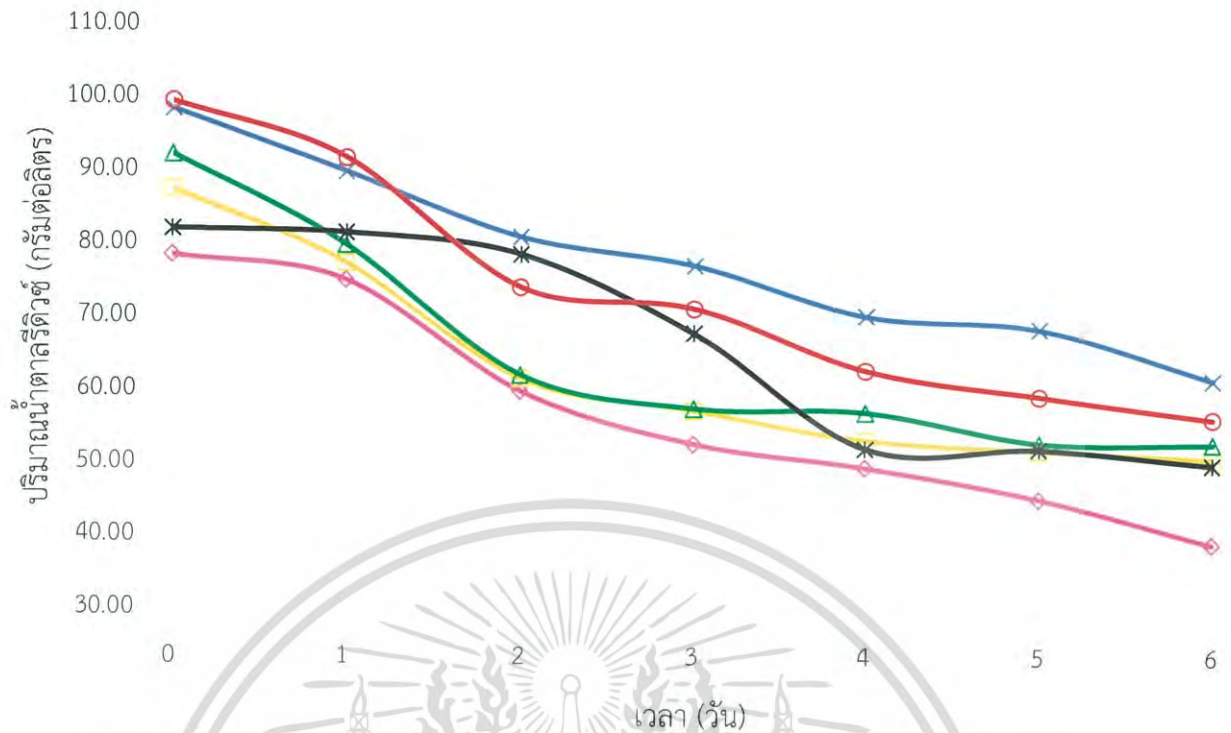
เมื่อเปรียบเทียบการใช้กากน้ำตาลอ้อยที่ปรับสภาพด้วยวิธีที่แตกต่างกันเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตแอสซีมมาเลตโดย *Acetobacter* sp. BX2 พบว่า *Acetobacter* sp. BX2 สามารถใช้กากน้ำตาลอ้อยที่ไม่ปรับสภาพและใช้น้ำตาลในกากน้ำตาลอ้อยที่ปรับสภาพได้ทุกวิธี โดยกากน้ำตาลอ้อยที่ไม่ปรับสภาพและกากน้ำตาลอ้อยที่ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกและแอสซีมไฮดรอกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอน ในช่วง 2 วันแรก ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงอย่างรวดเร็วอย่างเห็นได้ชัด หลังจากนั้นปริมาณน้ำตาลจะลดลงอย่างต่อเนื่องจนกระทั่งถึงวันที่ 6 และการใช้กากน้ำตาลอ้อยปรับสภาพด้วยโพแทสเซียมเพอร์โรไซยาไนด์เป็นแหล่งคาร์บอน ในช่วง 2 วันแรกปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ยังคงที่ หลังจากนั้นลดลงอย่างรวดเร็ว และเริ่มคงที่ในวันที่ 5 ถึงวันที่ 6 ส่วนการใช้กากน้ำตาลอ้อยปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริก กากน้ำตาลอ้อยปรับสภาพด้วยถ่านกัมมันต์ และกากน้ำตาลอ้อยปรับสภาพด้วยแอสซีมไฮดรอกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอน ในช่วง 2 วันแรก ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงอย่างรวดเร็ว และลดลงอย่างเรื่อยๆ จนกระทั่งเริ่มคงที่ในวันที่ 6 (รูปที่ 4.2)

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณแอสซีมมาเลต โดยการใช้กากน้ำตาลอ้อยที่ไม่ปรับสภาพและกากน้ำตาลอ้อยที่ปรับสภาพทั้ง 5 วิธี ได้แก่ การปรับสภาพกากน้ำตาลอ้อยด้วยกรดซัลฟูริก การปรับสภาพกากน้ำตาลอ้อยด้วยถ่านกัมมันต์ การปรับสภาพกากน้ำตาลอ้อยด้วยแอสซีมไฮดรอกไซด์ การปรับสภาพกากน้ำตาลอ้อยด้วยโพแทสเซียมเพอร์โรไซยาไนด์ และการปรับสภาพกากน้ำตาลอ้อยด้วยกรดซัลฟูริกและแอสซีมไฮดรอกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า *Acetobacter* sp. BX2 สามารถผลิตแอสซีมมาเลตได้ 20.34 ± 1.24 18.14 ± 0.72 16.05 ± 0.79 18.42 ± 0.74 15.54 ± 1.51 และ 24.20 ± 1.46 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 4.2) จากการวิเคราะห์ค่าทางสถิติโดยใช้โปรแกรม minitab 18 แบบ One-way anova ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 (Rios, 2009) พบว่าการใช้กากน้ำตาลอ้อยที่ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกและแอสซีมไฮดรอกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอน เชื้อ *Acetobacter* sp. BX2 สามารถผลิตแอสซีมมาเลตได้สูงที่สุด ซึ่งการใช้กากน้ำตาลอ้อยที่ปรับสภาพด้วยวิธีแตกต่างกันเป็นแหล่งคาร์บอนส่งผลต่อองค์ประกอบของน้ำตาลในกากน้ำตาลอ้อย ทำให้ปริมาณแอสซีมมาเลต ผลได้ และอัตราการผลิตที่แตกต่างกัน แต่กากน้ำตาลอ้อยที่เป็นผลพลอยได้จากโรงงานผลิตน้ำตาลทรายที่ไม่ผ่านการปรับสภาพจะมีสารพิษที่ไปยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์และการผลิตกรดมาลิก ซึ่งการมีตะกอนโลหะหนัก เม็ดสี และเถ้ามากเกินไป จะเกิดขึ้นในระหว่างการกลั่นกากน้ำตาลอ้อยให้บริสุทธิ์ ส่งผลให้ลดกระบวนการเมแทบอลิซึมของเซลล์และผลผลิตของผลิตภัณฑ์ลดลง ดังนั้นจึงควรศึกษาวิธีการปรับสภาพต่างๆ เพื่อกำจัดโลหะหนักของกากน้ำตาลอ้อยเพื่อช่วยในการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์และการผลิตกรดมาลิก (Cazetta และคณะ, 2007; Lafourcad และคณะ, 1979; Xia และคณะ, 2016) โดยการปรับสภาพกากน้ำตาลอ้อยด้วยถ่านกัมมันต์และโพแทสเซียมเพอร์โรไซยาไนด์เป็นวิธีการกำจัดไอออนโลหะหนักโดยใช้หลักการดูดซับ โดยโมเลกุลของถ่านกัมมันต์มีพื้นที่ผิวมากทำให้สามารถดูดซับไอออนโลหะหนักออกจากสารละลายได้ แล้วเกิดการตกตะกอน ส่วนโพแทสเซียมเพอร์โรไซยาไนด์ทำหน้าที่ตกตะกอนโลหะหนักคล้ายกับสารคีเลต และวิธีการปรับสภาพกากน้ำตาลอ้อยด้วยแอสซีมไฮดรอกไซด์เป็นวิธีการกำจัดไอออน

โลหะหนัก โดยไฮดรอกไซด์จะจับกับไอออนโลหะหนักแล้วเกิดการตกตะกอน ส่วนวิธีการปรับสภาพกากน้ำตาลอ้อยด้วยกรดซัลฟูริกเป็นการตกตะกอนโลหะหนักด้วยซัลไฟด์และยังเป็นการย่อน้ำตาลที่เป็นโมเลกุลคู่ในกากน้ำตาลอ้อยเปลี่ยนเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (Fu และ Wang, 2011) แต่การปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกและแคลเซียมไฮดรอกไซด์สามารถผลิตแคลเซียมมาเลตได้สูงที่สุดเนื่องจากเป็นการตกตะกอนไฮดรอกไซด์ร่วมกับซัลไฟด์ โดยการเติมกรดซัลฟูริกเป็นตัวย่อน้ำตาลโมเลกุลคู่ (น้ำตาลซูโครส) ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักในกากน้ำตาลอ้อยให้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว ได้แก่ น้ำตาลกลูโคสและฟรุกโตส นอกจากนี้ยังช่วยตกตะกอนโลหะหนักอีกด้วย และเมื่อมีการให้ความร้อนร่วมด้วยจะเกิดการเร่งปฏิกิริยาให้เร็วขึ้นและการเติมแคลเซียมไฮดรอกไซด์สามารถลดปริมาณโลหะหนักได้โดยการจับกับไอออนของโลหะหนักเป็นกลุ่มแล้วเกิดการตกตะกอน (Bower และคณะ, 2008) จากรายงานของ Abdel-Rahman และคณะ (2016) และ Roukas (1998) ได้ทำการศึกษาการปรับสภาพกากน้ำตาลอ้อย พบว่าการปรับสภาพกากน้ำตาลอ้อยด้วยกรดซัลฟูริกและแคลเซียมไฮดรอกไซด์ สามารถสลายน้ำตาลโมเลกุลคู่เป็นโมเลกุลเดี่ยวได้มากถึงร้อยละ 98.5 ± 1.5 และตกตะกอนโลหะหนักได้ดีที่สุด ดังนั้นในการทดลองนี้จึงเลือกใช้กากน้ำตาลอ้อยที่ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกและแคลเซียมไฮดรอกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อนำไปศึกษาในการทดลองต่อไป



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.2 กราฟแสดงปริมาณน้ำตาสดริตซ์ที่เหลือเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Acetobacter sp. BX2* ในอาหาร calcium malate production โดยการใช้กากน้ำตาลอ้อยที่ไม่ปรับสภาพ (◇) กากน้ำตาลอ้อยปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริก (□) ปรับสภาพด้วยกลีเซอรอล (△) ปรับสภาพด้วยแคลเซียมไฮดรอกไซด์ (×) ปรับสภาพด้วยโพแทสเซียมเพอร์โรไซยาไนด์ (*) และปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกและแคลเซียมไฮดรอกไซด์ (○) เป็นแหล่งคาร์บอน

4.3 ผลของการใช้กากน้ำตาลอ้อยที่ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกและแคลเซียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตแคลเซียมมาเลตโดย *Acetobacter sp. BX2*

ทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Acetobacter sp. BX2* ในอาหาร calcium malate production (ภาคผนวก ก.1.3) ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร ใช้กากน้ำตาลอ้อยที่ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกและแคลเซียมไฮดรอกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอน โดยทำการปรับความเข้มข้นของกากน้ำตาลอ้อยให้มีปริมาณน้ำตาลรีตซ์เริ่มต้นเท่ากับ 50 100 150 และ 200 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ถ่ายเชื้อร้อยละ 10 โดยปริมาตร ลงในอาหาร (ภาคผนวก ก.1.3) นำไปบ่มที่สถานะเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นนำตัวอย่างน้ำหมักของแต่ละวันไปทำการวัดปริมาณน้ำตาลรีตซ์ด้วยวิธีดีเอ็นเอส (Miller, 1959) และตกตะกอนแคลเซียมมาเลตด้วยเมทานอล (Wang และคณะ, 2013) แล้วนำไปวิเคราะห์ปริมาณแคลเซียมมาเลตด้วยวิธีการไทเทรต (FAO, 2006) ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 4.3 และรูปที่ 4.3

จากตารางที่ 4.3 เมื่อทำการเพาะเลี้ยง *Acetobacter sp. BX2* ในอาหารเหลว calcium malate production โดยการใช้กากน้ำตาลอ้อยที่ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกและแคลเซียมไฮดรอกไซด์ที่มี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้สำหรับใช้ภายในห้องสมุดเท่านั้น ไม่สามารถนำไปเผยแพร่โดยไม่ขออนุญาต
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความเข้มข้นเริ่มต้น 50 100 150 และ 200 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ตามลำดับ พบว่าการใช้กากน้ำตาลอ้อยที่ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกและแคลเซียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 200 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนสามารถผลิตแคลเซียมมาเลตได้สูงสุดเท่ากับ 40.27 ± 1.60 กรัมต่อลิตร และมีผลได้และอัตราการผลิตเท่ากับ 0.36 ± 0.01 กรัมต่อกรัมน้ำตาล และ 0.28 ± 0.011 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นซึ่งเท่ากับ 195.42 ± 1.38 กรัมต่อลิตร ในช่วงวันที่ 1 และวันที่ 2 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงอย่างรวดเร็วเหลือ 163.75 ± 2.46 และ 143.33 ± 4.96 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในวันที่ 3 ถึงวันที่ 4 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ยังคงลดลงอย่างต่อเนื่องเหลือ 102.42 ± 2.13 และ 92.17 ± 2.13 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือในวันที่ 5 เท่ากับ 84.08 ± 2.50 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการเพาะเลี้ยง *Acetobacter* sp. BX2 เป็นเวลา 5 วัน ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ถูกใช้เท่ากับ 111.33 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 57.00 (รูปที่ 4.3)

เมื่อทำการเพาะเลี้ยง *Acetobacter* sp. BX2 ในอาหารเหลว calcium malate production ที่มีกากน้ำตาลอ้อยที่ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกและแคลเซียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน สามารถผลิตแคลเซียมมาเลต ผลได้ และอัตราการผลิตเท่ากับ 9.40 ± 1.95 กรัมต่อลิตร 0.49 ± 0.10 กรัมต่อกรัมน้ำตาล และ 0.07 ± 0.014 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นซึ่งเท่ากับ 41.98 ± 0.30 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 1 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงเพียงเล็กน้อย โดยลดลงเหลือ 38.50 ± 0.95 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 2 และ 3 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงอย่างเห็นได้ชัด โดยลดลงเหลือ 29.71 ± 1.63 และ 29.70 ± 0.67 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในวันที่ 4 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงอย่างต่อเนื่อง โดยลดลงเหลือ 26.40 ± 0.58 กรัมต่อลิตร และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือในวันที่ 5 เท่ากับ 22.77 ± 0.25 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการเพาะเลี้ยง *Acetobacter* sp. BX2 เป็นเวลา 5 วัน ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ถูกใช้เท่ากับ 19.19 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 45.73 (รูปที่ 4.3)

เมื่อใช้กากน้ำตาลอ้อยที่ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกและแคลเซียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน สามารถผลิตแคลเซียมมาเลต ผลได้ และอัตราการผลิตเท่ากับ 25.51 ± 3.55 กรัมต่อลิตร 0.70 ± 0.10 กรัมต่อกรัมน้ำตาล และ 0.18 ± 0.025 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นซึ่งเท่ากับ 112.83 ± 1.59 กรัมต่อลิตร ในช่วงวันที่ 1, 2 และ 3 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 107.67 ± 1.59 100.83 ± 1.94 และ 95.00 ± 1.09 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในวันที่ 4 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงอย่างเห็นได้ชัดเหลือ 81.92 ± 1.53 กรัมต่อลิตร และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือในวันที่ 5 เท่ากับ 76.17 ± 1.28 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการเพาะเลี้ยง *Acetobacter* sp. BX2 เป็นเวลา 5 วัน ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ถูกใช้เท่ากับ 36.67 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 32.50 (รูปที่ 4.3)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อใช้กากน้ำตาลอ้อยที่ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกและแคลเซียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นเริ่มต้น 150 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน สามารถผลิตแคลเซียมมาเลต ผลได้ และอัตราการผลิตเท่ากับ 30.75 ± 0.39 กรัมต่อลิตร 0.35 ± 0.00 กรัมต่อกรัมน้ำตาล และ 0.21 ± 0.002 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นซึ่งเท่ากับ 140.50 ± 1.32 กรัมต่อลิตร ในช่วงวันที่ 1 และวันที่ 2 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงอย่างรวดเร็วเหลือ 120.50 ± 1.32 และ 93.42 ± 1.66 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในวันที่ 3 ถึงวันที่ 4 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงอย่างต่อเนื่องเหลือ 79.25 ± 2.78 และ 71.00 ± 1.56 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือในวันที่ 5 เท่ากับ 52.58 ± 1.26 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการเพาะเลี้ยง *Acetobacter* sp. BX2 เป็นเวลา 5 วัน ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ถูกใช้เท่ากับ 87.92 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 62.58 (รูปที่ 4.3)

เมื่อเปรียบเทียบการใช้น้ำตาลรีดิวซ์ของกากน้ำตาลอ้อยที่ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกและแคลเซียมไฮดรอกไซด์ของแต่ละความเข้มข้นเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า *Acetobacter* sp. BX2 สามารถใช้น้ำตาลรีดิวซ์ได้ทุกความเข้มข้น โดยแบ่งการใช้น้ำตาลรีดิวซ์เป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มแรก การใช้กากน้ำตาลอ้อยที่ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกและแคลเซียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 50 และ 100 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ในช่วงเริ่มต้นถึงวันที่ 5 มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงเพียงเล็กน้อย และกลุ่มที่สอง การใช้กากน้ำตาลอ้อยที่ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกและแคลเซียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 150 และ 200 กรัมต่อลิตร ในช่วงวันที่ 1 2 และ 3 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงอย่างเห็นได้ชัด หลังจากนั้นในวันที่ 4 และ 5 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงอย่างต่อเนื่อง

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณแคลเซียมมาเลต โดยการใช้กากน้ำตาลอ้อยที่ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกและแคลเซียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 50 100 150 และ 200 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า *Acetobacter* sp. BX2 สามารถผลิตแคลเซียมมาเลตได้ 9.40 ± 1.95 25.51 ± 3.55 30.75 ± 0.39 และ 40.27 ± 1.60 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 4.3) จากการวิเคราะห์ค่าทางสถิติโดยใช้โปรแกรม minitab 18 แบบ One-way anova ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 (Rios, 2009) พบว่าการใช้กากน้ำตาลอ้อยที่ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกและแคลเซียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 200 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน *Acetobacter* sp. BX2 สามารถผลิตแคลเซียมมาเลตได้ดีที่สุด ซึ่งการใช้กากน้ำตาลอ้อยที่ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกและแคลเซียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันเป็นแหล่งคาร์บอนทำให้ได้ปริมาณแคลเซียมมาเลต ผลได้และอัตราการผลิตที่แตกต่างกัน ดังนั้นเมื่อความเข้มข้นของกากน้ำตาลอ้อยสูงขึ้นจะส่งผลต่อปริมาณของน้ำตาลในกากน้ำตาลอ้อยทำให้ปริมาณแคลเซียมมาเลตเพิ่มขึ้น ซึ่งคล้ายกับรายงานของ Cheng และคณะ (2017) ได้ศึกษาการผลิตกรดมาลิกโดย *Aureobasidium pullulans* จากกากน้ำตาลถั่วเหลือง พบว่าเมื่อใช้กากน้ำตาลถั่วเหลืองที่ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกและแคลเซียมไฮดรอกไซด์ โดยมีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น 175 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน สามารถผลิตกรดมาลิกได้เท่ากับ 23.30 ± 1.70 กรัมต่อลิตร และเมื่อเพิ่มความ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาค้นคว้าเท่านั้น ไม่อนุญาตให้เผยแพร่หรือใช้ในเชิงการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

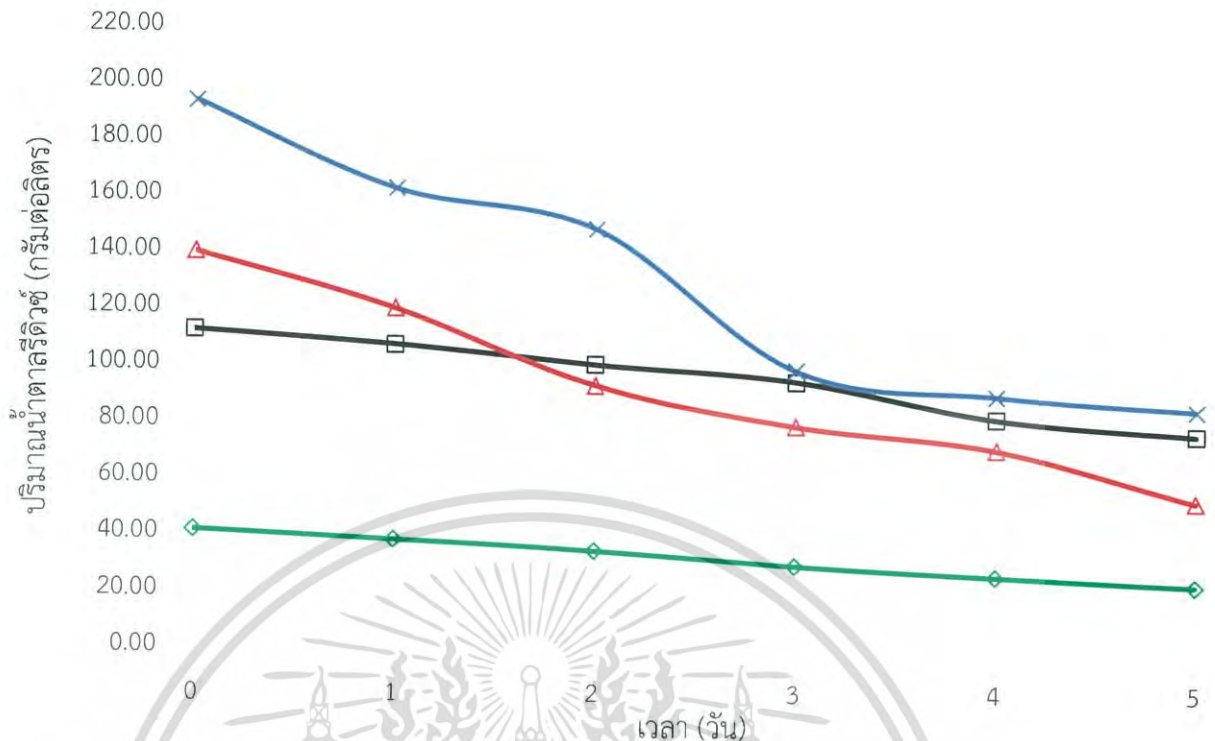
เข้มข้นปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นจาก 175 กรัมต่อลิตร เป็น 300 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตกรดมาลิกได้สูงถึง 41.50 ± 9.90 กรัมต่อลิตร แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเป็น 500 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตกรดมาลิกได้ลดลง เนื่องจากมีข้อจำกัดโดยกากน้ำตาลถั่วเหลืองเมื่อความเข้มข้นเพิ่มสูงขึ้น ส่งผลให้เกิดแรงดันออสโมติกสูงขึ้น ทำให้กระบวนการเมแทบอลิซึมของเซลล์และการผลิตกรดมาลิกลดลง (Lafourcad และคณะ, 1979) และจากรายงานของ Zou และคณะ (2013) ได้ศึกษาการผลิตกรดมาลิกโดย *Aureobasidium pullulans* พบว่า การใช้น้ำตาลกลูโคสความเข้มข้นเริ่มต้น 150 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน สามารถผลิตกรดมาลิกได้เท่ากับ 54.90 ± 2.33 กรัมต่อลิตร และผลได้สูงที่สุดเท่ากับ 0.72 ± 0.02 กรัมต่อกรัมกลูโคส เนื่องจากผลของความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นมีผลต่อการผลิตกรดมาลิก ซึ่งกรดมาลิกเป็นตัวกลางในวัฏจักรกรดไตรคาร์บอกซิลิก และการสังเคราะห์กรดมาลิกมีปริมาณที่มากนั้นจำเป็นต้องมีน้ำตาลกลูโคสที่เป็นสารตั้งต้นในปริมาณที่มากเกินไปสำหรับการผลิตกรดมาลิก ดังนั้นความเข้มข้นของกลูโคสที่สูงจะส่งผลให้ปริมาณกรดมาลิก ผลได้ และอัตราการผลิตสูงขึ้นตามไปด้วย ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นที่เหมาะสมของจุลินทรีย์นั้นๆ เพราะถ้าหากความเข้มข้นมากเกินไปอาจจะทำให้เซลล์ไม่สามารถนำไปใช้งานได้หมด และเกิดสภาวะที่สารตั้งต้นจะเป็นตัวไปยับยั้งสารผลิตภัณฑ์ (Substrate inhibition) จึงส่งผลให้ผลิตกรดมาลิกลดลง แต่เนื่องจากข้อจำกัดของโครงการพิเศษนี้ พบว่ากากน้ำตาลอ้อยที่ใช้ เมื่อปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกและแคลเซียมไฮดรอกไซด์ในอัตราส่วนระหว่างกากน้ำตาลอ้อยต่อน้ำกลั่นเป็น 3:1 สามารถเพิ่มปริมาณความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นได้สูงที่สุดเท่ากับ 200 กรัมต่อลิตร ทำให้ไม่อาจทราบได้ว่าเมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นที่สูงกว่า 200 กรัมต่อลิตร จะสามารถผลิตแคลเซียมมาเลตได้มากขึ้นหรือน้อยลง ดังนั้นในการทดลองนี้จึงใช้กากน้ำตาลที่ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกและแคลเซียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 200 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อนำไปศึกษาในการทดลองต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 แสดงปริมาณแคลเซียมมาเลต ผลได้ และอัตราการผลิตของเชื้อ *Acetobacter* sp. BX2 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่ใช้กากน้ำตาลอ้อยที่ปรับสภาพอ้อยด้วยกรดซัลฟูริกและแคลเซียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นแตกต่างกันเป็นแหล่งคาร์บอน

ความเข้มข้นของกากน้ำตาลอ้อยที่ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกและแคลเซียมไฮดรอกไซด์ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	แคลเซียมมาเลต (กรัมต่อลิตร)	ผลได้ (กรัมต่อกรัมน้ำตาล)	อัตราการผลิต (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)
50	41.96 ± 0.30	22.77 ± 0.25	9.40 ^c ± 1.95	0.49 ^b ± 0.10	0.07 ^c ± 0.014
100	112.83 ± 1.59	76.17 ± 1.28	25.51 ^b ± 3.55	0.70 ^a ± 0.10	0.18 ^b ± 0.025
150	140.50 ± 1.32	52.58 ± 1.26	30.75 ^b ± 0.39	0.35 ^b ± 0.00	0.21 ^b ± 0.002
200	195.42 ± 1.38	84.08 ± 2.50	40.27 ^a ± 1.60	0.36 ^b ± 0.01	0.28 ^a ± 0.011

หมายเหตุ ค่าที่รายงานทั้งหมดคือค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการทดลอง ค่าที่ทำเครื่องหมายด้วยตัวอักษรเดียวกันในคอลัมน์นี้ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ในขณะที่ตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมน์นี้มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.0



รูปที่ 4.3 กราฟแสดงปริมาณน้ำตาเลรีดิวซ์ที่เหลือเมื่อทำการเพาะเลี้ยง *Acetobacter* sp. BX2 ในอาหาร calcium malate production ที่มีกากน้ำตาลอ้อยที่ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกและแคลเซียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 50 (◇) 100 (□) 150 (△) และ 200 (×) กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เป็นแหล่งคาร์บอน

4.4 ผลของการใช้แหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้นแตกต่างกันในการผลิตแคลเซียมมาเลตโดย *Acetobacter* sp. BX2

ทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Acetobacter* sp. BX2 ในอาหาร calcium malate production (ภาคผนวก ก.1.3) ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร และใช้กากน้ำตาลอ้อยที่ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกและแคลเซียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 200 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และใช้ corn steep liquor ความเข้มข้นร้อยละ 0 0.25 0.5 0.75 และ 1 โดยปริมาตร เป็นแหล่งไนโตรเจน ตามลำดับ ถ่ายเชื้อร้อยละ 10 โดยปริมาตร ลงในอาหาร (ภาคผนวก ก.1.3) นำไปบ่มที่สภาวะเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 วัน จากนั้นนำตัวอย่างน้ำหมักของแต่ละวันมาทำการวัดปริมาณน้ำตาเลรีดิวซ์ด้วยวิธีดีเอ็นเอส (Miller, 1959) และตกตะกอนแคลเซียมมาเลตด้วยเมทานอล (Wang และคณะ, 2013) แล้วนำไปวิเคราะห์ปริมาณแคลเซียมมาเลตด้วยวิธีการไทเทรต (FAO, 2006) ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 4.4 และรูปที่ 4.4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากตารางที่ 4.4 เมื่อทำการเพาะเลี้ยง *Acetobacter* sp. BX2 ในอาหารเหลว calcium malate production ที่ใช้กากน้ำตาลอ้อยที่ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกและแคลเซียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้น 200 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และใช้ corn steep liquor ความเข้มข้นร้อยละ 0 0.25 0.5 0.75 และ 1 โดยปริมาตร เป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่าแหล่งไนโตรเจนความเข้มข้นร้อยละ 0.25 โดยปริมาตร สามารถผลิตแคลเซียมมาเลตได้สูงสุดเท่ากับ 38.25 ± 0.88 กรัมต่อลิตร และมีผลได้และอัตราการผลิตเท่ากับ 0.40 ± 0.01 กรัมต่อกรัมน้ำตาล และ 0.002 ± 0.00 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นซึ่งเท่ากับ 197.33 ± 0.29 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 1 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 192.50 ± 0.50 กรัมต่อลิตร ซึ่งลดลงเพียงเล็กน้อย และในช่วงวันที่ 2, 3, 4 และ 5 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงอย่างต่อเนื่องเหลือ 172.75 ± 1.52 144.55 ± 0.50 115.25 ± 0.90 และ 102.67 ± 0.52 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือในวันที่ 6 เท่ากับ 99.25 ± 0.66 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Acetobacter* sp. BX2 เป็นเวลา 6 วัน ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ถูกใช้เท่ากับ 98.08 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 49.70 (รูปที่ 4.4)

เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Acetobacter* sp. BX2 ในอาหารเหลว calcium malate production ที่ใช้ corn steep liquor ความเข้มข้นร้อยละ 0 โดยปริมาตร และใช้กากน้ำตาลอ้อยที่ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกและแคลเซียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 200 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน สามารถผลิตแคลเซียมมาเลต ผลได้ และอัตราการผลิตเท่ากับ 35.22 ± 0.65 กรัมต่อลิตร 0.40 ± 0.01 กรัมต่อกรัมน้ำตาล และ 0.002 ± 0.00 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นซึ่งเท่ากับ 194.08 ± 3.62 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 1 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 190.50 ± 1.09 กรัมต่อลิตร ซึ่งลดลงเพียงเล็กน้อย ในช่วงวันที่ 2 3 4 และ 5 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงอย่างต่อเนื่องเหลือ 172.08 ± 0.38 143.92 ± 1.51 139.92 ± 1.13 และ 108.75 ± 1.09 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือในวันที่ 6 เท่ากับ 105.17 ± 0.38 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Acetobacter* sp. BX2 เป็นเวลา 6 วัน ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ถูกใช้เท่ากับ 88.92 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 45.83 (รูปที่ 4.4)

เมื่อใช้ corn steep liquor ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยปริมาตร เป็นแหล่งไนโตรเจน และใช้กากน้ำตาลอ้อยที่ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกและแคลเซียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 200 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน สามารถผลิตแคลเซียมมาเลต ผลได้ และอัตราการผลิตเท่ากับ 37.49 ± 0.55 กรัมต่อลิตร 0.34 ± 0.00 ต่อกรัมน้ำตาล และ 0.002 ± 0.00 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นซึ่งเท่ากับ 196.83 ± 0.52 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 1 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 193.50 ± 1.00 กรัมต่อลิตร ซึ่งลดลงเพียงเล็กน้อย ในช่วงวันที่ 2 3 4 และ 5 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงอย่างต่อเนื่องเหลือ 172.58 ± 0.63 147.17 ± 0.52 117.58 ± 0.38 และ 98.67 ± 1.04 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือในวันที่ 6 เท่ากับ

เอกสารนี้เป็นลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

85.33 ± 0.80 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Acetobacter* sp. BX2 เป็นเวลา 6 วัน ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ถูกใช้เท่ากับ 111.05 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 56.65 (รูปที่ 4.4)

เมื่อใช้ corn steep liquor ความเข้มข้นร้อยละ 0.75 โดยปริมาตร เป็นแหล่งไนโตรเจน และใช้กากน้ำตาลอ้อยที่ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกและแคลเซียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้น 200 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน สามารถผลิตแคลเซียมมาเลต ผลได้ และอัตราการผลิตเท่ากับ 35.17 ± 2.67 กรัมต่อลิตร 0.35 ± 0.03 กรัมต่อกรัมน้ำตาล และ 0.002 ± 0.00 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นซึ่งเท่ากับ 199.08 ± 0.95 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 1 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 196.00 ± 1.09 กรัมต่อลิตร ในช่วงวันที่ 2 3 4 และ 5 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงอย่างต่อเนื่องเหลือ 173.67 ± 1.13 145.17 ± 0.52 123.00 ± 0.66 และ 111.83 ± 0.95 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือในวันที่ 6 เท่ากับ 99.83 ± 1.26 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Acetobacter* sp. BX2 เป็นเวลา 6 วัน ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ถูกใช้เท่ากับ 99.25 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 49.85 (รูปที่ 4.4)

เมื่อใช้ corn steep liquor ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยปริมาตร เป็นแหล่งไนโตรเจน และใช้กากน้ำตาลอ้อยที่ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกและแคลเซียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้น 200 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน สามารถผลิตแคลเซียมมาเลต ผลได้ และอัตราการผลิตเท่ากับ 32.52 ± 1.00 กรัมต่อลิตร 0.37 ± 0.01 กรัมต่อกรัมน้ำตาล และ 0.002 ± 0.00 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นซึ่งเท่ากับ 197.75 ± 0.66 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 1 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 192.25 ± 0.50 กรัมต่อลิตร ซึ่งลดลงเพียงเล็กน้อย และในช่วงวันที่ 2 3 4 และ 5 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงอย่างต่อเนื่องเหลือ 173.75 ± 1.15 144.83 ± 0.80 132.66 ± 0.52 และ 120.75 ± 1.09 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือในวันที่ 6 เท่ากับ 110.58 ± 0.76 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Acetobacter* sp. BX2 เป็นเวลา 6 วัน ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ถูกใช้เท่ากับ 87.17 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 44.08 (รูปที่ 4.4)

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยใช้กากน้ำตาลอ้อยปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกและแคลเซียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้น 200 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และใช้ corn steep liquor ความเข้มข้นร้อยละ 0 0.25 0.5 0.75 และ 1 โดยปริมาตร เป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่า *Acetobacter* sp. BX2 มีการใช้น้ำตาลรีดิวซ์ในวันที่ 1 เพียงเล็กน้อย หลังจากนั้นในวันที่ 2 3 4 5 และ 6 ปริมาณน้ำตาลจะลดลงอย่างต่อเนื่อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

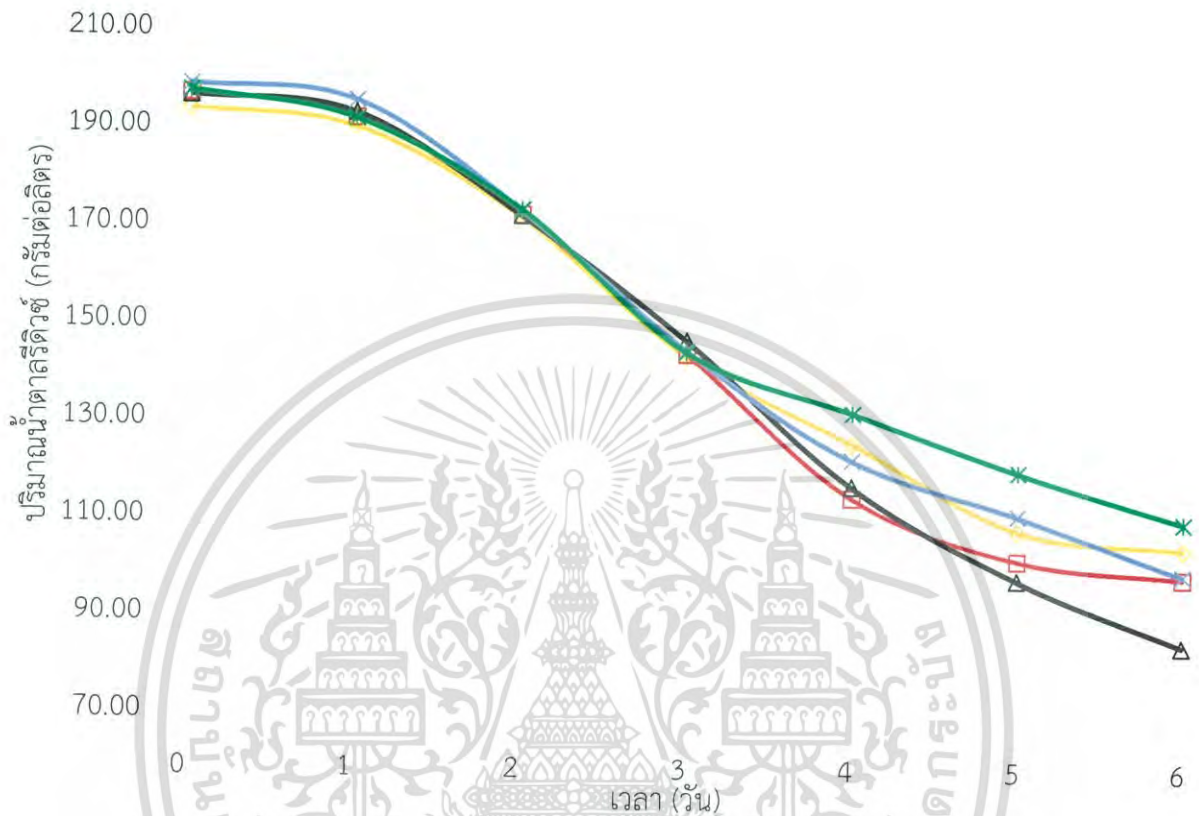
ตารางที่ 4.4 ตารางแสดงปริมาณแคลเซียมมาเลต ผลได้ และอัตราการผลิตของเชื้อ *Acetobacter* sp. BX2 เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหารที่ใช้ corn steep liquor ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันเป็นแหล่งไนโตรเจน

ความเข้มข้นของ corn steep liquor (ร้อยละโดยปริมาตร)	ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	แคลเซียมมาเลต (กรัมต่อลิตร)	ผลได้ (กรัมต่อกรัมน้ำตาลที่ใช้)	อัตราการผลิต (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)
0	194 ± 3.62	105.17 ± 0.38	35.22 ^{ab} ± 0.65	0.40 ^a ± 0.01	0.002 ^a ± 0.00
0.25	197.33 ± 0.29	99.25 ± 0.66	38.25 ^a ± 0.88	0.40 ^a ± 0.01	0.002 ^{ab} ± 0.00
0.5	196.83 ± 0.52	85.33 ± 0.80	37.49 ^a ± 0.55	0.34 ^c ± 0.00	0.002 ^c ± 0.00
0.75	199.08 ± 0.95	99.83 ± 1.26	35.17 ^{ab} ± 2.67	0.35 ^{bc} ± 0.03	0.002 ^{bc} ± 0.00
1.0	197.75 ± 0.66	110.58 ± 0.76	32.52 ^b ± 1.00	0.37 ^{abc} ± 0.01	0.002 ^{abc} ± 0.00

หมายเหตุ ค่าที่รายงานทั้งหมดคือค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการทดลอง ค่าที่ทำเครื่องหมายด้วยตัวอักษรเดียวกันในคอลัมน์นี้ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ในขณะที่ตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมน์นี้มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณแคลเซียมมาเลต โดยใช้ corn steep liquor ความเข้มข้นร้อยละ 0 0.25 0.5 0.75 และ 1 โดยปริมาตร เป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่า *Acetobacter* sp. BX2 สามารถผลิตแคลเซียมมาเลตได้ 35.22 ± 0.65 38.25 ± 0.88 37.49 ± 0.55 35.17 ± 2.67 และ 32.52 ± 1.00 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 4.4) จากการวิเคราะห์ค่าทางสถิติโดยใช้โปรแกรม minitab 18 แบบ One-way anova ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 (Rios, 2009) พบว่าการใช้ corn steep liquor ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.25 โดยปริมาตร เชื้อ *Acetobacter* sp. BX2 สามารถผลิตแคลเซียมมาเลตได้สูงที่สุด โดยสอดคล้องกับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ลดลง ซึ่งแตกต่างจากรายงานของ Khan และคณะ (2014) ได้ศึกษาการผลิตแคลเซียมมาเลตจาก *Penicillium viticola* 152 โดยใช้ corn steep liquor เป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่าเมื่อใช้ corn steep liquor ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยปริมาตร สามารถผลิตแคลเซียมมาเลตได้สูงสุดถึง 122.0 ± 3.9 กรัมต่อลิตร และจากรายงานของ Wang และคณะ 2015 ได้ศึกษาการปรับปรุงการผลิตกรดพอลิมาลิกโดย *Aureobasidium pullulans* var. *pullulans* MCW พบว่าเมื่อใช้ corn steep liquor ความเข้มข้นร้อยละ 0.75 โดยปริมาตร เป็นแหล่งไนโตรเจน สามารถผลิตแคลเซียมมาเลตได้สูงที่สุดเท่ากับ 121.31 กรัมต่อลิตร ซึ่งการสังเคราะห์กรดมาลิกผ่านเมแทบอลิซึมต่างๆ ได้แก่ Direct reduction of oxaloacetate วัฏจักรกรดไตรคาร์บอกซิลิก วัฏจักรไกลออกซิเลต และวัฏจักรไกลออกซิเลตแบบไม่เต็มวง ทั้งนี้การเข้าสู่ เมแทบอลิซึมการผลิตกรดมาลิกแบบใดนั้นขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ (Magnuson และ Lasure, 2004; Zelle และคณะ, 2008) โดยการสังเคราะห์กรดมาลิกทางชีวภาพมีเอนไซม์ที่สำคัญอยู่ 2 ชนิด คือ เอนไซม์ไพรูเวทคาร์บอกซิเลส (pyruvate carboxylase; PYC) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาเปลี่ยนไพรูเวทไปเป็นออกซาโลอะซิเตต และเอนไซม์มาเลตดีไฮโดรจีเนส (malate dehydrogenase; MDH) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาเปลี่ยนมาเลตไปเป็นออกซาโลอะซิเตต โดย PYC เป็นเอนไซม์ tetrameric ที่มีไบโอตินเป็นโคเอนไซม์ช่วยเร่งปฏิกิริยาการคาร์บอกซิเลชันของไพรูเวทให้เป็นออกซาโลอะซิเตต ดังนั้นจำเป็นต้องใช้ไบโอตินเป็นโคเอนไซม์ในการสังเคราะห์กรดมาลิกทางชีวภาพ เนื่องจาก corn steep liquor เป็นผลพลอยได้หลักของอุตสาหกรรมแปรรูปแป้งข้าวโพดและเป็นแหล่งวัตถุดิบที่มีราคาถูก ซึ่งองค์ประกอบขึ้นอยู่กับกระบวนการแปรรูปแป้งข้าวโพดของแต่ละอุตสาหกรรม แต่โดยทั่วไปแล้วจะประกอบไปด้วยไนโตรเจน วิตามินที่ละลายในน้ำ เช่น ไบโอติน กรดอะมิโน แร่ธาตุ และของแข็งประมาณร้อยละ 50 (Miller และ Churchill, 1986) นอกจากนี้ corn steep liquor ยังมีสารประกอบที่ทำหน้าที่เป็นแหล่งคาร์บอนส่งเสริมการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ เช่น เดกซ์โทรส ร้อยละ 1.2 มอลโตโบโอสร้อยละ 0.64 มอลโตไตรโอสร้อยละ 4.0 กรดแลคติกร้อยละ 4.8 และ กลีเซอรอล ร้อยละ 0.3 เป็นต้น (Amartey และ Jeffries, 1994) ซึ่งการผลิตกรดอินทรีย์เริ่มขึ้นหลังจากปริมาณไนโตรเจนลดลง เนื่องจากปริมาณไนโตรเจนส่งผลต่อปริมาณเซลล์เมื่อเซลล์มีปริมาณมากขึ้นจะสามารถผลิตกรดอินทรีย์เพิ่มขึ้น ดังนั้นปริมาณไนโตรเจนที่เหมาะสมจะส่งผลต่อปริมาณเซลล์และการผลิตกรดอินทรีย์เพิ่มขึ้น แต่ในทางตรงกันข้ามเมื่อปริมาณไนโตรเจนมากเกินไปเซลล์จะนำไปใช้ในการเจริญมากกว่าการผลิตผลิตภัณฑ์ ส่งผลให้การผลิตกรดอินทรีย์ลดลง (Ochsenreither และคณะ

,2014) ดังนั้นในการทดลองนี้จึงใช้ corn steep liquor ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.25 โดยปริมาตร เป็นแหล่งไนโตรเจนเพื่อนำไปศึกษาในการทดลองต่อไป



รูปที่ 4.4 กราฟแสดงปริมาณน้ำตาลที่ละลายที่เหลือเมื่อทำการเพาะเลี้ยง *Acetobacter* sp. BX2 ในอาหาร calcium malate production ที่ใช้ corn steep liquor ความเข้มข้นร้อยละ 0 (●) 0.25 (□) 0.5 (△) 0.75 (×) และ 1 (×) โดยปริมาตร เป็นแหล่งไนโตรเจน

4.5 ผลของการผลิตและอัตราการผลิตแคลเซียมมาเลตโดย *Acetobacter* sp. BX2 เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหาร calcium malate production ที่มีกากน้ำตาลอ้อยที่ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกและแคลเซียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 200 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และมี corn steep liquor ความเข้มข้นร้อยละ 0.25 โดยปริมาตร เป็นแหล่งไนโตรเจน

ทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Acetobacter* sp. BX2 ในอาหาร calcium malate production (ภาคผนวก ก.1.3) ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร โดยใช้กากน้ำตาลอ้อยที่ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกและแคลเซียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 200 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และใช้ corn steep liquor ความเข้มข้นร้อยละ 0.25 โดยปริมาตร เป็นแหล่ง

ไนโตรเจน ถ่ายเชื้อร้อยละ 10 โดยปริมาตร นำไปบ่มที่สภาวะเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นนำตัวอย่างน้ำหมักของแต่ละวันมาทำการวัดค่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้เฉพาะในโครงการเท่านั้น ไม่สามารถนำข้อมูลไปใช้

ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธีดีเอ็นเอส (Miller, 1959) และตกตะกอนแคลเซียมมาเลตด้วยเมทานอล (Wang และคณะ, 2013) แล้วนำไปวิเคราะห์ปริมาณแคลเซียมมาเลตด้วยวิธีการไทเทรต (FAO, 2006) ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 4.5 และรูปที่ 4.5

จากตารางที่ 4.5 เมื่อเพาะเลี้ยง *Acetobacter* sp. BX2 ในอาหารเหลว calcium malate production โดยใช้กากน้ำตาลอ้อยที่ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกและแคลเซียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 200 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และใช้ corn steep liquor ความเข้มข้นร้อยละ 0.25 โดยปริมาตร เป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่าวันที่ 2 สามารถผลิตแคลเซียมมาเลตได้เท่ากับ 23.43 ± 0.72 กรัมต่อลิตร และมีผลได้ และอัตราการผลิตสูงสุดเท่ากับ 0.93 ± 0.02 กรัมต่อกรัมน้ำตาล และ 0.49 ± 0.01 กรัมต่อลิตรต่อลิตร ตามลำดับ

เมื่อทำการเพาะเลี้ยง *Acetobacter* sp. BX2 ในอาหารเหลว calcium malate production เป็นเวลา 5 วัน โดยการใช้กากน้ำตาลอ้อยที่ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกและแคลเซียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นเริ่มต้น 200 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และใช้ corn steep liquor ความเข้มข้นร้อยละ 0.25 โดยปริมาตร เป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงเพียงเล็กน้อยในวันที่ 1 โดยลดลงจากปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นซึ่งเท่ากับ 197.25 ± 0.90 กรัมต่อลิตร ลดลงเหลือ 190.83 ± 0.76 กรัมต่อลิตร ซึ่งปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ถูกใช้เท่ากับ 6.42 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 2.97 โดยเชื้อ *Acetobacter* sp. BX2 สามารถผลิตแคลเซียมมาเลตได้ 5.86 ± 0.63 กรัมต่อลิตร ผลได้ 0.91 ± 0.03 กรัมต่อกรัมน้ำตาล และมีอัตราการผลิต 0.24 ± 0.03 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง (ตารางที่ 4.5)

ในวันที่ 2 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงเหลือ 172.00 ± 0.90 กรัมต่อลิตร ซึ่งปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ถูกใช้เท่ากับ 25.25 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 12.80 โดยเชื้อ *Acetobacter* sp. BX2 สามารถผลิตแคลเซียมมาเลตได้ 23.43 ± 0.72 กรัมต่อลิตร ผลได้ 0.93 ± 0.02 กรัมต่อกรัมน้ำตาล และมีอัตราการผลิต 0.49 ± 0.01 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง (ตารางที่ 4.5)

ในวันที่ 3 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงเหลือ 142.25 ± 0.90 กรัมต่อลิตร ซึ่งปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ถูกใช้เท่ากับ 55.00 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 45.03 โดยเชื้อ *Acetobacter* sp. BX2 สามารถผลิตแคลเซียมมาเลตได้ 33.81 ± 0.90 กรัมต่อลิตร ผลได้ 0.61 ± 0.02 กรัมต่อกรัมน้ำตาล และมีอัตราการผลิต 0.47 ± 0.01 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง (ตารางที่ 4.5)

ในวันที่ 4 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงเหลือ 108.42 ± 0.52 กรัมต่อลิตร ซึ่งปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ถูกใช้เท่ากับ 88.83 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 45.03 โดยเชื้อ *Acetobacter* sp. BX2 สามารถผลิตแคลเซียมมาเลตได้ 37.23 ± 0.96 กรัมต่อลิตร ผลได้ 0.42 ± 0.01 กรัมต่อกรัมน้ำตาล และมีอัตราการผลิต 0.39 ± 0.01 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง (ตารางที่ 4.5)

ในวันที่ 5 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงเหลือ 96.92 ± 1.28 กรัมต่อลิตร ซึ่งปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ถูกใช้เท่ากับ 100.33 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 50.86 โดยเชื้อ *Acetobacter* sp. BX2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้สำหรับใช้ในการศึกษาวิจัยเท่านั้น เมื่อผู้เช่าได้พิมพ์เอกสารนี้ขึ้นการดำเนินการจะไม่ว่ากรณิใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สามารถผลิตแคลเซียมมาเลตได้ 38.52 ± 1.08 กรัมต่อลิตร ผลได้ 0.38 ± 0.01 กรัมต่อกรัมน้ำตาล และมีอัตราการผลิต 0.32 ± 0.01 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง (ตารางที่ 4.5)

เมื่อเปรียบเทียบการใช้น้ำตาลในการผลิตแคลเซียมมาเลต เมื่อทำการเพาะเลี้ยง *Acetobacter* sp. BX2 เป็นเวลา 5 วัน พบว่าในวันที่ 1 2 3 4 และ 5 สามารถผลิตแคลเซียมมาเลตได้ 5.86 ± 0.63 23.43 ± 0.72 33.81 ± 0.90 37.23 ± 0.96 และ 38.52 ± 1.08 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 4.5) จากการวิเคราะห์ค่าทางสถิติด้วยโปรแกรม minitab แบบ One-way anova ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 (Rios, 2009) พบว่าการใช้กากน้ำตาลอ้อยที่ปรับสภาพด้วยกรด ซัลฟูริกและแคลเซียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 200 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และใช้ corn steep liquor ความเข้มข้น 0.25 โดยปริมาตร เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยเชื้อ *Acetobacter* sp. BX2 จากรูปที่ 4.5 จะเห็นได้ว่าในวันที่ 1 เริ่มผลิตแคลเซียมมาเลตได้ในปริมาณเล็กน้อยซึ่งสอดคล้องกับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ลดลงเพียงเล็กน้อย เนื่องจากเซลล์อาจอยู่ในระยะ lag phase ซึ่งเป็นระยะที่เซลล์จะปรับตัวให้เข้ากับอาหารและสร้างเอนไซม์ โปรตีน และส่วนประกอบอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมแทบอลิซึมของเซลล์ ทำให้มีอัตราการผลิตแคลเซียมมาเลตต่ำที่สุด ส่วนในวันที่ 2 3 และ 4 ปริมาณแคลเซียมมาเลตเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัดซึ่งสอดคล้องกับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ลดลงอย่างรวดเร็ว โดยในวันที่ 2 มีอัตราการผลิตแคลเซียมมาเลตสูงที่สุด เนื่องจากเซลล์อาจใช้น้ำตาลกลูโคสที่เป็นองค์ประกอบในกากน้ำตาลอ้อยในการเพิ่มจำนวนและการผลิตแคลเซียมมาเลตในระยะแรก ซึ่งในระยะนี้เซลล์อาจมีการเพิ่มจำนวนสูงสุด เรียกว่าระยะ log phase เมื่อเซลล์มีปริมาณมากขึ้นจะสามารถผลิตกรดอินทรีย์เพิ่มขึ้นทำให้อัตราการผลิตสูงขึ้น (Ochsenreither และคณะ, 2014) และในวันที่ 5 ปริมาณแคลเซียมมาเลตเริ่มคงที่ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ลดลงเพียงเล็กน้อย เนื่องจากเซลล์อาจเริ่มเข้าสู่ระยะ stationary phase ซึ่งในระยะนี้น้ำตาลกลูโคสใกล้หมดทำให้เซลล์อาจเปลี่ยนมาใช้น้ำตาลฟรุกโตส ซูโครส และน้ำตาลชนิดอื่นที่เป็นองค์ประกอบในกากน้ำตาลอ้อยในการผลิตแคลเซียมมาเลต โดยระยะนี้เซลล์จะไม่มี การเพิ่มจำนวน แต่ยังมี การผลิตแคลเซียมมาเลต โดยคาดว่าแคลเซียมมาเลตเป็นสารเมแทบอลิท์ทุติยภูมิ (secondary metabolite) เพราะเป็นสารที่เซลล์สร้างขึ้นมาในระหว่างการเจริญ แต่ไม่เกี่ยวข้องกับการเจริญของเซลล์ นอกจากนี้ของเสียที่เซลล์สร้างอาจไปยับยั้งการเจริญหรือการผลิตผลิตภัณฑ์ได้ จึงส่งผลให้อัตราการผลิตแคลเซียมมาเลตลดลง (Alsuhaim และคณะ, 2012)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 แสดงปริมาณแคลเซียมมาเลต ผลได้ และอัตราการผลิตของเชื้อ *Acetobacter* sp. BX2 โดยใช้กากน้ำตาลอ้อยที่ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริก และแคลเซียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 200 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และใช้ corn steep liquor ความเข้มข้นร้อยละ 0.25 โดยปริมาตร เป็นแหล่งไนโตรเจน

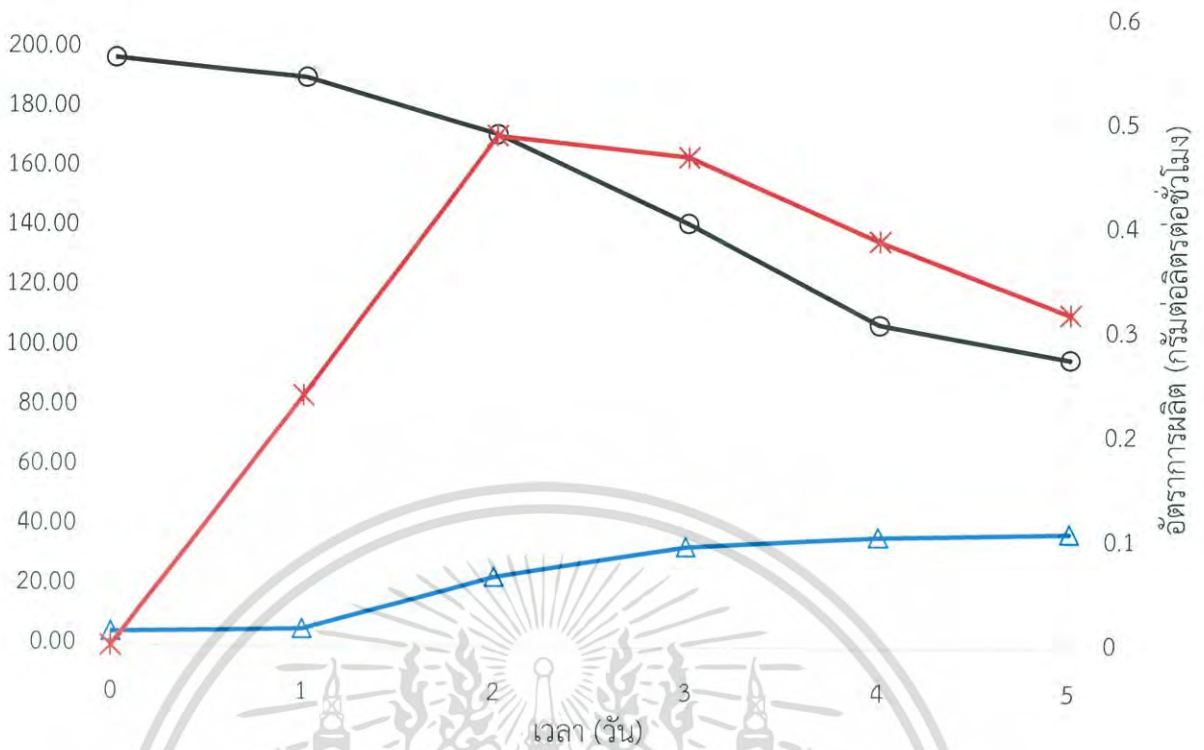
วันที่	ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	แคลเซียมมาเลต (กรัมต่อลิตร)	ผลได้ (กรัมต่อกรัมน้ำตาล)	อัตราการผลิต (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)
0	197.25 ± 0.90	4.78 ^d ± 0.55	0.00 ^b ± 0.00	0.00 ^e ± 0.00
1	190.83 ± 0.76	5.86 ^d ± 0.63	0.91 ^a ± 0.03	0.24 ^d ± 0.03
2	172.00 ± 0.90	23.43 ^c ± 0.72	0.93 ^a ± 0.02	0.49 ^a ± 0.01
3	142.25 ± 0.90	33.81 ^b ± 0.90	0.61 ^b ± 0.02	0.47 ^b ± 0.01
4	108.42 ± 0.52	37.23 ^a ± 0.69	0.42 ^c ± 0.01	0.39 ^c ± 0.01
5	96.92 ± 1.28	38.52 ^a ± 1.08	0.38 ^c ± 0.01	0.32 ^d ± 0.01

หมายเหตุ

ค่าที่รายงานทั้งหมดคือค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการทดลอง ค่าที่ทำเครื่องหมายด้วยตัวอักษรเดียวกันในคอลัมน์นี้ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ในขณะที่ตัวอักษรที่ต่างกันมีค่าความแตกต่างทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

ปริมาณแคลเซียมมาเลต (กรัมต่อลิตร)

ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)



รูปที่ 4.5 กราฟแสดงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ (O) ปริมาณแคลเซียมมาเลต (Δ) และอัตราการผลิตแคลเซียมมาเลต (X) เมื่อทำการเพาะเลี้ยง *Acetobacter* sp. BX2 ในอาหาร calcium malate production ที่มีกากน้ำตาลอ้อยที่ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกและแคลเซียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้น 200 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และใช้ corn steep liquor ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.25 โดยปริมาตร เป็นแหล่งไนโตรเจน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลงานวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลงานวิจัย

1. จากการศึกษาผลของการใช้น้ำตาลกลูโคส ฟรุคโตส และซูโครส เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตแคลเซียมมาเลต พบว่าเชื้อ *Acetobacter* sp. BX2 สามารถใช้น้ำตาลกลูโคส เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตแคลเซียมมาเลตได้สูงที่สุดเท่ากับ 34.87 ± 0.19 กรัมต่อลิตร รองลงมาคือการใช้ น้ำตาลซูโครสและฟรุคโตส เป็นแหล่งคาร์บอน ตามลำดับ

2. จากการศึกษาผลของการใช้กากน้ำตาลอ้อยที่ปรับสภาพด้วยวิธีต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตแคลเซียมมาเลต พบว่าการใช้กากน้ำตาลอ้อยที่ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกและ แคลเซียมไฮดรอกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอน สามารถผลิตแคลเซียมมาเลตได้สูงที่สุดเท่ากับ 24.20 ± 1.46 กรัมต่อลิตร

3. จากการศึกษาผลของการใช้กากน้ำตาลอ้อยที่ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกและแคลเซียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตแคลเซียมมาเลต พบว่าการใช้ กากน้ำตาลอ้อยความเข้มข้น 200 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน สามารถผลิตแคลเซียมมาเลตได้สูงที่สุดเท่ากับ 40.27 ± 1.60 กรัมต่อลิตร

4. จากการศึกษาผลของการใช้แหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน พบว่าการใช้ corn steep liquor ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.25 โดยปริมาตร สามารถผลิตแคลเซียมมาเลตได้สูงที่สุดเท่ากับ 38.25 ± 0.88 กรัมต่อลิตร

5. จากการศึกษาการผลิตและอัตราการผลิตแคลเซียมมาเลต โดยใช้กากน้ำตาลอ้อยที่ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกและแคลเซียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 200 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และใช้ corn steep liquor ความเข้มข้นร้อยละ 0.25 โดยปริมาตร เป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่าวันที่ 2 มีอัตราการผลิตสูงสุดเท่ากับ 0.49 ± 0.01 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และในวันที่ 5 มีปริมาณแคลเซียมมาเลตสูงสุดเท่ากับ 38.52 ± 0.01 กรัมต่อลิตร

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. ควรศึกษาการผลิตกรดมาลิกโดยใช้แหล่งคาร์บอนที่เป็นของเหลือทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมชนิดอื่นๆ เช่น กากน้ำตาลถั่วเหลือง กากน้ำตาลหัวบีช และกลีเซอรอล เป็นต้น และวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร เช่น ชังข้าวโพด ฟางข้าว และเปลือกฝักข้าวโพดอ่อน เป็นต้น

2. ควรศึกษาปัจจัยอื่นๆ เช่น ความเร็วรอบในการเขย่า อุณหภูมิ และค่าพีเอช ที่อาจมีผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตแคลเซียมมาเลต โดย *Acetobacter* sp. BX2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

- ประภัสสร เทพกัณฑ์ และ สุพรรณิภา ยอดสง่า. 2557. การคัดแยกจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตกรดอะดีพิกจากแหล่งธรรมชาติ. โครงการพิเศษระดับวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- Abdel-Rahman G. N., Nassar N. R. A., Heika Y. A., Abou-Donia M. A. M., Naguib M. M., Fadel M. 2016. "Effect of Different Treatment on Heavy Metal Concentration in Sugar Cane Molasses." *International Scholarly and Scientific Research and Innovation*. 10(1) : 43-48.
- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Martin R., Roberts K., Walter P. 2002. "The Complete Citric Acid Cycle." *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition. 2(9) : 36-54.
- Alsuhaime H., Vojisavljevic V., Pirogova E. 2012. "Effects of Non-thermal Microwave Exposures on the Proliferation Rate of *Saccharomyces cerevisiae* Yeast." *World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering, IFMBE Proceedings*. 39 : 48-51.
- Amartey S., Jeffries T. W., 1994. "Comparison of Corn Steep Liquor with other Nutrients in the Fermentation of D-Xylose by *Pichia stipitis* CBS 6054." *Biotechnology Letters*. 16(2) : 211-214.
- Antonelli M. L., Spadaro C., Rosalia S., Tornelli R. F. 2008. "A Microcalorimetric Sensor for Food and Cosmetic Analyses: L-Malic Acid Determination." *Talanta*. 74(5) : 1450-1454.
- Aydogan C., Karakoç V., Denizli A. 2015. "Chiral Ligand-Exchange Separation and Determination of Malic Acid Enantiomers in Apple Juice by Open-Tubular Capillary Electrochromatography." *Food Chemistry*. 187 : 130 -134.
- Battat E., Peleg Y., Bercovitz A., Rokem J.S., Goldberg I. 1991. "Optimization of L-Malic Acid Production by *Aspergillus flavus* in a Stirred Fermentor." *Biotechnology and Bioengineering*. 37(11) : 1108-1116.
- Berg J. M., Tymoczko J. L., Stryer L. 2002. "The Glyoxylate Cycle Enables Plants and Bacteria to Grow on Acetate." *Biochemistry*. 5th edition. 17(4) : 170-175.
- Bhainsa K. C., D'Souza S. F. 2008. "Removal of Copper Ions by the Filamentous Fungus, *Rhizopus oryzae* from Aqueous Solution." *Bioresource Technology*. 99(9) : 3829-3835.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Branson J. P., Nezcic M., Wallace J. C., Attwood P. V. 2002. "Kinetic Characterization of Yeast Pyruvate Carboxylase Isozyme Pyc1." *Biochemistry*. 41(13) : 4459–4466.
- Bressler E., Pines O., Goldberg I., Braun S. 2008. "Conversion of Fumaric Acid to L-Malic by Sol-Gel Immobilized *Saccharomyces cerevisiae* in a Supported Liquid Membrane Bioreactor." *Biotechnology Progress*. 18(3) : 445–450.
- Brown S. H., Bashkirova L., Berka R., Chandler T., Doty T., McCall K., McCulloch M., McFarland S., Thompson S., Yaver D., Berry A. 2013. "Metabolic Engineering of *Aspergillus oryzae* NRRL 3488 for Increased Production of L-Malic Acid." *Applied Microbiology and Biotechnology*. 97(20) : 8903–8912.
- Bower S., Wickramasinghe R., Nagle N. J., Schell D. J. 2008. "Modeling Sucrose Hydrolysis in Dilute Sulfuric Acid Solution at Pretreatment Conditions for Lignocellulosic Biomass." *Bioresource Technology*. 99(15) : 7354-7362.
- Cazetta M. L., Celligoi M. A. P. C., Buzato J. B., Scarmino I. S. 2007. "Fermentation of Molasses by *Zymomonas mobilis* : Effects of Temperature and Sugar Concentration on Ethanol Production." *Bioresource Technology*. 98(15) : 2824-2828.
- Chaudhry R., Varacallo M. 2018. "Biochemistry, Glycolysis." *National Center for Biotechnology Information*. 1-4.
- Cheng C. C., Zhou Y., Lin M., Wei P., Yang S. T. 2017. "Polymalic Acid Fermentation by *Aureobasidium pullulans* for Malic Acid Production from Soybean Hull and Soy Molasses : Fermentation Kinetics and Economic Analysis." *Bioresource Technology*. 223 : 166-174.
- Chi Z., Wang Z. P., Wang G. Y., Khan I., Chi Z. M. 2016. "Microbial Biosynthesis and Secretion of L-Malic Acid and Its Applications." *Critical Reviews in Biotechnology*. 36 : 99–107.
- Dai Z., Zhou H., Zhang S., Gu H., Yang Q., Zhang W., Dong W., Ma J., Fang Y., Jiang M., Xin F. 2018. "Current Advance in Biological Production of Malic Acid Using Wild Type and Metabolic Engineered Strains." *Bioresource technology*. 258 : 345-353.
- Dorsam S., Kirchhoff J., Bigalke M., Dahmen N., Syldatk C., Ochsenreither K. 2016. "Evaluation of Pyrolysis Oil as Carbon Source for Fungal Fermentation." *Frontiers in Microbiology* 7 : 1-11.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่จัดทำขึ้นเพื่อใช้ในการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Dubois M., Gilles K. A., Hamilton J. K., Rebers P. A., Smith F. 1956. "Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances." *Analytical Chemistry*. 28(3) : 350-356.
- Feher J. 2017. "ATP Production I : Glycolysis." *Quantitative Human Physiology* (2nd Edition). 218-226.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2006. "Combined Compendium of Food Additive Specifications." Italy : Viable Delle Terme Di Caracalla.
- Fu F., Wang Q. 2011. "Removal of Heavy Metal Ions from Wastewaters : A Review." *Journal of Environmental Management*. 92(3) : 407-418.
- Goldberg I., Rokem J. S., Pines O. 2006. "Organic Acids: Old Metabolites, New Themes." *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. 81(10) : 1601-1611.
- Isao T., Kozo Y., Tetsuya T., Ichiro C. 1980. "Immobilization of *Brevibacterium flavum* with Carrageenan and Its Application for Continuous Production of L-Malic Acid." *Enzyme and Microbial Technology*. 2(1) : 30-36.
- Iyyappana J., Baskarb G., Bharathirajaa B., Saravanathamizhanc R. 2018. "Malic Acid Production from Biodiesel Derived Crude Glycerol Using Morphologically Controlled *Aspergillus niger* in Batch Fermentation." *Bioresource Technology*. 269 : 393-399.
- Jiang M. Q., Jin X. Y., Lu X. Q., Chen Z. L., 2010. "Adsorption of Pb(II), Cd(II), Ni(II) and Cu(II) onto Natural Kaolinite Clay." *Desalination*. 252(1-3) : 33-39.
- Khan I., Nazir K., Wang Z. P., Liu G. L., Chi Z. M. 2014. "Calcium Malate Overproduction by *Penicillium viticola* 152 Using the Medium Containing Corn Steep Liquor." *Applied Microbiology and Biotechnology*. 98(4) : 1539-1546.
- Knuf C., Nookaew I., Brow S. H., McCulloch M., Berry A., Nielsen J. 2013. "Investigation of Malic Acid Production in *Aspergillus oryzae* Under Nitrogen Starvation Condition." *Applied and Environmental microbiology*. 19(79) : 6050-6058.
- Kozo Y., Tetsuya T., Kiyokazu Y., Ichiro C. 1976. "Continuous Production of L-Malic Acid by Immobilized *Brevibacterium ammoniayenes* cells." *European journal of Applied Microbiology and Biotechnology*. 3(3) : 169-183.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Lafourcad S. L., Larue F., Gayon P. R. 1979. "Evidence for the Existence of "Survival Factors" as an Explanation for Some Peculiarities of Yeast Growth, Especially in Grape Must of High Sugar Concentration." *Applied and Environmental Microbiology*. 38(6) : 1069-1073.
- Leathers T. D., Manitchotpsit P. 2013. "Production of Poly (Beta-L-malic Acid) (PMA) from Agricultural Biomass Substrates by *Aureobasidium pullulans*." *Biotechnology Letters*. 35(11) : 83-89.
- Lewis I. E., Bartholomew N. O. 1994. "Effect of Molasses Concentration and Medium Supplementation on the Adaptability and Viability of a High Level Ethanol-tolerant Palm-Wine *Saccharomyces* isolate." *Biotechnology Letters*. 16(1) : 95-100.
- Li X., Liu Y., Yang Y., Zhang H., Wang H., Wu Y., Zhang M., Sun T., Cheng J., Wu X., Pan L., Jiang S., Wu H. 2014. "High Levels of Malic Acid Production by the Conversion of Corn Straw Hydrolysate Using an Isolated *Rhizopus delemar* Strain." *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 19 : 478-492.
- Liu G., Zhou Y., Luo H., Cheng X., Zhang R., Teng, W. 2015. "A Comparative Evaluation of Different Types of Microbial Electrolysis Desalination Cells for Malic Acid Production." *Bioresource Technology*. 198 : 87-93.
- Nuno J., Melo S. D. 2016. "Microbiology of Vinegar : From Isolation, Phenetic Characterization and Detection of Acetic Acid Bacteria to Microbial Profiling of an Industrial Production." *Tecnico Lisboa*. 1-47.
- Magnuson M., Lasure L., 2004. "Malic Acid." *Microbial Production of Food Ingredients, Enzymes and Nutraceuticals*. 308-312.
- Matlock M. M., Henke K. R., Atwood D. A. 2002. "Effectiveness of Commercial Reagents for Heavy Metal Removal from Water with New Insights for Future Chelate Designs." *Journal of Hazardous Materials*. 92(2) : 129-142.
- Mikio K., Keiichi H., Shin I. S., Koujirou M., Kazumitsu N. 1997. "Application of Bubble Column Fermentors to Submerged Culture of *Schizophyllum commune* for Production of L-Malic Acid." *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 84(4) : 333-336.
- Miller G. L. 1959. "Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar." *Analytical Chemistry*. 31(3) : 426-428.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Miller T. L., Churchill B. W. 1986. "Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology American Society of Microbiology 3rd." Washington D.C. 122-136.
- Moon S. Y., Hong S. H., Kim T. Y., Lee S. Y. 2008. "Metabolic Engineering of *Escherichia coli* for the Production of Malic Acid." *Biochemical Engineering Journal*. 40(2) : 312-320.
- Nicolettil I., Corradini C., Cogliandro E., Cavazza A. 1999. "Determination of Alpha-Hydroxy Acids Incosmetic Products by High-Performance Liquid Chromatography with a Narrow-bore Column." *International Journal of Cosmetic Science*. 21(4) : 265-274.
- Ochsenreither K., Fischer C., Neumann A., Syldatk C. 2014. "Process Characterization and Influence of Alternative Carbon Sources and Carbon-to-Nitrogen Ratio on Organic Acid Production by *Aspergillus oryzae* DSM1863." *Applied Microbiology and Biotechnology*. 98(12) : 5449-5460.
- Olbrich H. 2006. "THE MOLASSES." *Biotechnologie-Kempe GmbH*. 3-23.
- Ortiz R. W. P., Beninca C., Filho-cardozo L., Zanoelo E. F. 2017. "High-Pressure Acid Catalyzed Isomerization and Hydration of Fumaric Acid in a Homogenous Nonisothermal Batch Reactor." *Industrial and Engineering Chemistry Research*. 56 : 3873-3879.
- Oswald F., Dorsam S., Veith N., Zwick M., Neumann A., Ochsenreither K., Syldatk C. 2016. "Sequential Mixed Cultures : from Syngas to Malic Acid." *Frontiers in Microbiology*. 7 : 1-12.
- Patra K. C., Hay N. 2014. "The Pentose Phosphate Pathway and Cancer." *Trends in Biochemical Sciences*. 39(8) : 347-354.
- Peleg Y., Stieglitz B., Goldberg L. 1988. "Malic Acid Accumulation by *Aspergillus flavus*." *Applied Microbiology and Biotechnology*. 28(1) : 69-75.
- Piyarom S., Yonemochil E., Oguchi T., Yamamoto K. 1997. "Effects of Grinding and Humidification on the Transformation of Conglomerate to Racemic Compound in Optically Active Drugs." *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 49(4) : 384-389.
- Pixels. (2559). Acetobacter Photographs. สืบค้นเมื่อ 14 มิถุนายน 2562, จาก <https://pixels.com/featured/acetobacter-aceti-bacteria-scimat.html>

Pushpa B. 2002. "Finishing of Textile Materials." *journal of applied polymer science*. 83(3) : 631-659.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อผู้ดูแลเนื้อหาเว็บไซต์นี้ดำเนินการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Raybaudi-Massilia R., Durán A. Z., Melgar J. M., Calderon-Gabaldon M. I. 2012. "Improving the Safety and Shelf-Life of Orange and Mango Juices Using *Panax ginseng*, Malic Acid and Potassium Sorbate." *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*. 7(4) : 273–282.
- Rios M. 2009. "Guife oF Minitab." *Business Statistics*. 3-21.
- Roukas T., 1998. "Pretreatment of Beet Molasses to Increase Pullulan Production." *Process Biochemistry*. 33(8) : 805-810.
- Silalertruksa T., Gheewala S. H. 2018. "Land-Water-Energy Nexus of Sugarcane Production in Thailand." *Journal of Cleaner Production*. 182 : 521-528.
- Takeshi T., Teruhide S., Tsuguo I., Tadaatsu N., Junta S. 1981. "Itaconic Acid Fermentation by a Yeast Belonging to the Genus *Candida*." *Agricultural and Biological Chemistry*. 45(2) : 475-479.
- Taing O, Taing K. 2007. "Production of Malic and Succinic Acids by Sugar-tolerant Yeast *Zygosaccharomyces rouxii*." *European Food Research and Technology*. 224 : 343–347.
- Teclu D., Tivchev G., Laing M., Wallis M. 2019. "Determination of the Elemental Composition of Molasses and Its Suitability as Carbon Source for Growth of Sulphate-Reducing Bacteria." *Journal of Hazardous Materials*. 161(2-3) : 1157–1165.
- Tomotani E. J., Vitolo M. 2010. "Inverted Sugar Syrup Attained from Sucrose Hydrolysis Using a Membrane Reactor." *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 46(3) : 571–577.
- Wang Z. P., Wang G. Y., Khan I., Chi Z. M. 2013. "High-Level Production of Calcium Malate from Glucose by *Penicillium sclerotiorum* K302." *Bioresour Technology*. 143 : 674-677.
- Wang Y. K., Chi Z., Zhou H. X., Liu G. L., Chi. Z. M. 2015. "Enhanced Production of Ca²⁺-Polymalate (PMA) with High Molecular Mass by *Aureobasidium pullulans* var. *pullulans* MCW." *Microbial Cell Factories*. 14(115) : 1-11
- Wang J., Lin M., Xu M., Yang S. T. 2016. "Anaerobic Fermentation for Production of Carboxylic Acids as Bulk Chemicals from Renewable Biomass." *Anaerobes in Biotechnology*. 156: 323-361.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Wei P., Cheng C., Lin M., Zhou Y., Yang S. T. 2017. "Production of Poly(malic acid) from Sugar cane Juice in Fermentation by *Aureobasidium pullulans*: Kinetics and Process Economics." *Bioresource Technology*. 224 : 581–589.
- West T. P. 2011. "Malic Acid Production from Thin Stillage by *Aspergillus* species." *Biotechnology Letters*. 33(12) : 2463–2467.
- West T. P. 2015. "Fungal Biotransformation of Crude Glycerol into Malic Acid." *Zeitschrift für Naturforschung Online*. 70(5-6) : 165–167.
- West T. 2017. "Microbial Production of Malic Acid from Biofuel-Related Coproducts and Biomass." *Fermentation*. 3(14) : 1-10.
- Xia J., Xu J., Hu L., Liu X. 2016. "Enhanced Poly (L-Malic acid) Production from Pretreated Cane Molasses by *Aureobasidium pullulans* in Fed- Batch Fermentation." *Preparative Biochemistry and Biotechnology*. 46(8) : 798-802.
- Xu S., Hao N., Xu L., Liu Z., Yan M., Li Y., Ouyang P. 2015. "Series Fermentation Production of Ornithine and Succinic Acid from Cane Molasses by *Corynebacterium glutamicum*." *Biochemical Engineering Journal*. 99(15) : 177-182.
- Zambanini T., Kleineberg W., Sarikaya E., Buescher J. M., Meurer G., Wierckx N., Blank L. B. 2016. "Enhanced Malic Acid Production from Glycerol with High-Density *Ustilago trichophora* TZ1 Cultivations." *Biotechnology for Biofuels*. 9(1) : 135-139.
- Zelle R. M., de Hulster E., van Winden W. A., de Waard P., Dijkema C., Winkler A. A., Geertman J. M. van Dijken J. P., Pronk J. T., van Maris A. J. 2008. "Malic Acid Production by *Saccharomyces cerevisiae*: Engineering of Pyruvate Carboxylation, Oxaloacetate Reduction, and Malate Export." *Applied and Environmental Microbiology*. 74(9) : 2766–2777.
- Zhang H., Cai J., Dong J., Zhang D., Huang L., Xu Z., Cen P.L. 2011. "High-Level Production of Poly (β -L-Malic Acid) with a New Isolated *Aureobasidium pullulans* Strain." *Applied Microbiology and Biotechnology*. 92 : 295–303.
- Zhang Y. Y., Bu Y. F., Liu J. Z. 2015. "Production of L-Ornithine from Sucrose and Molasses by Recombinant *Corynebacterium glutamicum*." *Folia Microbiologica*. 60(5) : 393–398.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Zou X., Zhou Y., Yang S. T. 2013. "Production of Polymalic Acid and Malic Acid by *Aureobasidium pullulans* Fermentation and Acid Hydrolysis." *Biotechnology and Bioengineering*. 110(8) : 2105-2113.
- Zou X., Yang J., Tian X., Guo M., Li Z., Li Y. 2016. "Production of Polymalic Acid and Malic Acid from Xylose and Corn cob Hydrolysate by a Novel *Aureobasidium pullulans* YJ 6-11 strain." *Process Biochemistry*. 51(1) : 16-23.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก
สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

ก.1 สูตรอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์

ก.1.1 สูตรอาหาร Selective Agar (Takeshi และคณะ, 1981)

Xylose	100	กรัมต่อลิตร
Yeast extract	5.0	กรัมต่อลิตร
KH_2PO_4	1.0	กรัมต่อลิตร
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.5	กรัมต่อลิตร
CaCO_3	5.0	กรัมต่อลิตร
Agar	20	กรัมต่อลิตร

ก.1.2 สูตรอาหาร Selective medium (Takeshi และคณะ, 1981)

Xylose	100	กรัมต่อลิตร
Yeast extract	5.0	กรัมต่อลิตร
KH_2PO_4	1.0	กรัมต่อลิตร
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.5	กรัมต่อลิตร
CaCO_3	5.0	กรัมต่อลิตร

ก.1.3 สูตรอาหาร Calcium malate production (Khan และคณะ, 2014)

แหล่งคาร์บอน	100	กรัมต่อลิตร
KH_2PO_4	0.1	กรัมต่อลิตร
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.1	กรัมต่อลิตร
KCl	0.5	กรัมต่อลิตร
Corn steep liquor (CSL)	0.5	ร้อยละโดยปริมาตร
CaCO_3	30	กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารละลายสำหรับการวิเคราะห์ทางเคมี

ข.1 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธีเอ็นเอส (Miller, 1959)

ข.1.1 การเตรียมสารละลาย 3,5-dinitrosalicylic (DNS) เข้มข้นร้อยละ 1 โดยมวลต่อปริมาตร (ปริมาตร 1 ลิตร)

ชั่งสาร 3,5-dinitrosalicylic (DNS) 10 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 250 มิลลิลิตร เติมสารละลายต่างที่ละน้อย (โซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 2 โมลาร์ เตรียมโดยชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 16 กรัมละลายในน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร) คนให้สารละลายเข้ากันจนหมด จนกระทั่งได้สารละลายใส จึงเติมโพแทสเซียมทาทาลงไปที่ละน้อย จนครบ 300 กรัม แล้วทำการปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นทำการเก็บสารละลายดีเอ็นเอสไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง

ข.1.2 การเตรียมสารละลายกลูโคสมาตรฐานหรือสารละลายไซโลสมาตรฐานความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ปริมาตร 100 มิลลิลิตร)

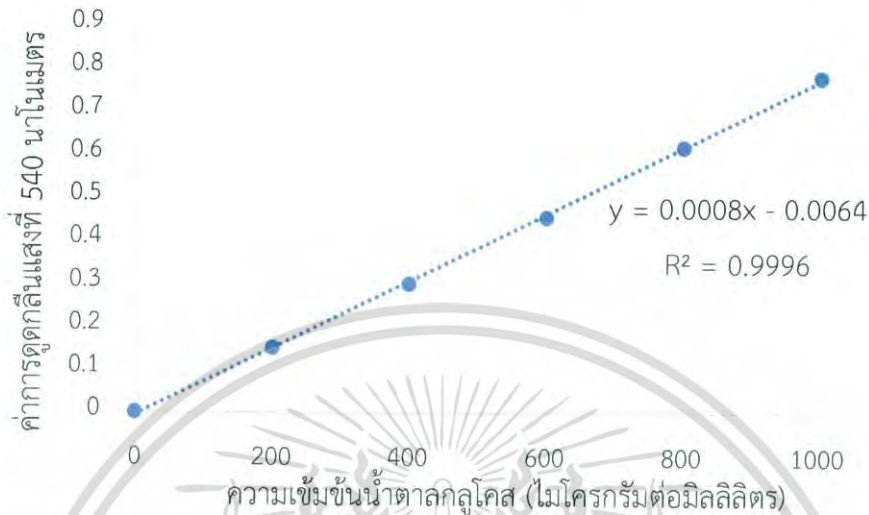
ทำการอบน้ำตาลกลูโคสหรือไซโลสที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในเดซิเคเตอร์เป็นเวลา 30 นาที ชั่งน้ำตาลกลูโคสหรือไซโลสที่ผ่านการอบ 0.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 20 มิลลิลิตร แล้วทำการปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสหรือไซโลสเริ่มต้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นจึงเจือจางสารละลายน้ำตาลกลูโคสมาตรฐานหรือสารละลายไซโลสมาตรฐานที่ความเข้มข้น 200 400 600 800 และ 1,000 ด้วยน้ำกลั่น ดังตารางที่ ข.1

ตารางที่ ข.1 แสดงการเตรียมสารละลายน้ำตาลกลูโคสหรือสารละลายไซโลสมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ

ปริมาตรของสารละลายน้ำตาลกลูโคสหรือไซโลสเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	ปริมาตรน้ำกลั่น (มิลลิลิตร)	ความเข้มข้นของสารละลายสุดท้าย (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)
0	5	0
1	4	200
2	3	400
3	2	600
4	1	800
5	0	1000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากนั้นสร้างกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคสหรือไซโลส โดยนำสารละลายน้ำตาลกลูโคสหรือไซโลสที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่เตรียมไว้ ทำการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธีดีเอ็นเอส (หัวข้อ 3.3.5-3.3.9) โดยใช้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ได้กราฟมาตรฐานดังรูปที่ ข.1 และ ข.2



รูปที่ ข.1 กราฟมาตรฐานสารละลายน้ำตาลกลูโคสสำหรับวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร และความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคส (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)



รูปที่ ข.2 กราฟมาตรฐานสารละลายน้ำตาลไซโลสสำหรับวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร และความเข้มข้นน้ำตาลไซโลส (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข.2 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธีฟินอลซัลฟูริก (Dubois และคณะ, 1956)

ข.2.1 การเตรียมสารละลายฟินอล (Phenol) เข้มข้นร้อยละ 5 โดยมวลต่อปริมาตร (ปริมาตร 100 มิลลิลิตร)

ชั่งฟินอล 5 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร คนให้ฟินอลละลายหมดจนกระทั่งได้สารละลายใส แล้วทำการปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร จากนั้นทำการเก็บสารละลายฟินอลไว้ในขวดสีชา ที่อุณหภูมิห้อง ควรเตรียมสารละลายฟินอลใช้แต่ละอาทิตย์

หมายเหตุ : การเตรียมสารละลายฟินอลควรทำในตู้ดูดควัน

ข.2.2 การเตรียมสารละลายน้ำตาลกลูโคสหรือไซโลสที่ความเข้มข้น 0, 20, 40, 60 และ 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

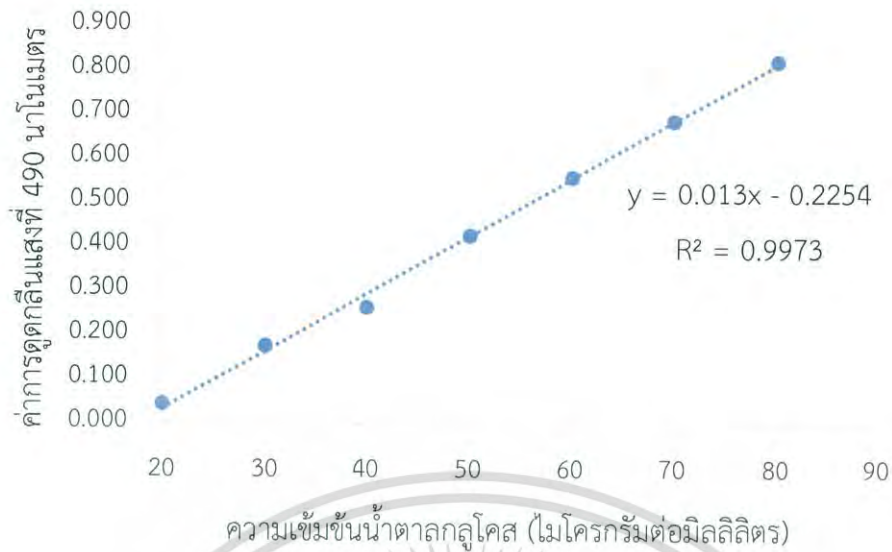
ทำการเจือจางสารละลายกลูโคสหรือไซโลสความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยปิ-เปต สารละลายน้ำตาลกลูโคสหรือไซโลสความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เตรียมได้จากภาคผนวก ข.1.2 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร แล้วทำการเติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร จากนั้นเจือจางสารละลายน้ำตาลกลูโคสหรือไซโลส ที่ความเข้มข้น 0 20 40 60 80 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น ดังตารางที่ ข.2

ตารางที่ ข.2 แสดงการเตรียมสารละลายน้ำตาลกลูโคสหรือสารละลายไซโลสมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ปริมาตรของสารละลายน้ำตาลกลูโคสหรือไซโลสเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	ปริมาตรน้ำกลั่น (มิลลิลิตร)	ความเข้มข้นของสารละลายสุดท้าย (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)
0	5	0
1	4	20
2	3	40
3	2	60
4	1	80
5	0	100

จากนั้นสร้างกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคสหรือไซโลส โดยนำสารละลายน้ำตาลกลูโคสหรือไซโลสที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่เตรียมไว้ ทำการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (หัวข้อ 3.3.5) โดยใช้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร ได้กราฟมาตรฐานดังรูปที่ ข.3 และ ข.4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ข.3 กราฟมาตรฐานสารละลายน้ำตาลกลูโคสสำหรับวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร และความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคส (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)



รูปที่ ข.4 กราฟมาตรฐานสารละลายน้ำตาลไซโลสสำหรับวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร และความเข้มข้นน้ำตาลไซโลส (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข.3 การวิเคราะห์ปริมาณแคลเซียมมาเลตด้วยวิธีการไทเทรต (FAO, 2006)

ข.3.1 การเตรียมสารละลายกรดเอทิลีนไดอะมีนเตตระอะซิติก

(Ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA)

$$\text{จากสูตร} \quad \frac{g}{Mw} = CV$$

โดย g คือ ปริมาณ EDTA

C คือ ความเข้มข้นของสารละลาย EDTA

V คือ ปริมาตรสารละลาย EDTA

Mw คือ มวลโมเลกุลของ EDTA เท่ากับ 372.24 กรัมต่อโมล

$$\text{แทนค่าตามสูตร} \quad \frac{g}{372.24 \text{ กรัมต่อโมล}} = 0.5 \text{ โมลต่อลิตร} \times 1 \text{ ลิตร}$$

$$= 18.612 \text{ กรัม}$$

ดังนั้นปริมาณ EDTA ที่ใช้เท่ากับ 18.612 กรัม

ซึ่ง EDTA 18.612 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 250 มิลลิลิตร คนให้ EDTA ละลายหมดจนกระทั่งได้สารละลายใส แล้วทำการปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มิลลิลิตร

ข.3.2 การเตรียมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1.075 โมลาร์

สูตรโมเลกุล NaOH

น้ำหนักมวลโมเลกุล (Mw) 40 กรัมต่อโมล

โซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 โมล ซึ่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 40 กรัม

ต้องการโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1.075 โมล ซึ่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ $\frac{40 \times 1.075}{1}$ กรัม

ต้องซึ่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 43 กรัม

สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1.075 โมลาร์ ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ซึ่งสาร 43 กรัม

ถ้าต้องการเตรียมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ซึ่งสาร $\frac{43 \times 500}{1,000}$ กรัม

ซึ่งสาร 21.50 กรัม

ดังนั้น ซึ่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 21.50 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 250 มิลลิลิตร คนให้โซเดียมไฮดรอกไซด์ละลายหมดจนกระทั่งได้สารละลายใส แล้วทำการปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 500 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข.3.3 การเตรียมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 2.7 โมลาร์

สูตรโมเลกุล HCl

น้ำหนักมวลโมเลกุล (Mw)	36.5	กรัมต่อโมล
ความหนาแน่น (d)	1.18	กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร
ความเข้มข้น (X)	37	ร้อยละโดยมวล

$$\begin{aligned}
 \text{จากสูตร} \quad \text{ความเข้มข้น (โมลาร์)} &= \frac{10dx}{Mw} \\
 &= \frac{10 \times 1.18 \times 37}{36.5} \\
 &= 11.9 \text{ โมลาร์}
 \end{aligned}$$

กรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้นร้อยละ 37 โดยมวล มีความเข้มข้นเท่ากับ 11.9 โมลาร์
ต้องการสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 2.7 โมลาร์ ปริมาตร 500 มิลลิลิตร

$$\begin{aligned}
 \text{จากสูตร} \quad C_1V_1 &= C_2V_2 \\
 V_1 &= \frac{2.7 \times 500}{11.9} \\
 &= 113.45 \text{ มิลลิลิตร}
 \end{aligned}$$

ดังนั้น ปีเปตกรดไฮโดรคลอริกปริมาตร 113.45 มิลลิลิตร ละลายในน้ำกลั่น 250 มิลลิลิตร คนให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วทำการปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 500 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

การคำนวณที่เกี่ยวข้อง

ค.1 การคำนวณหาปริมาณของน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบในกากน้ำตาลอ้อย

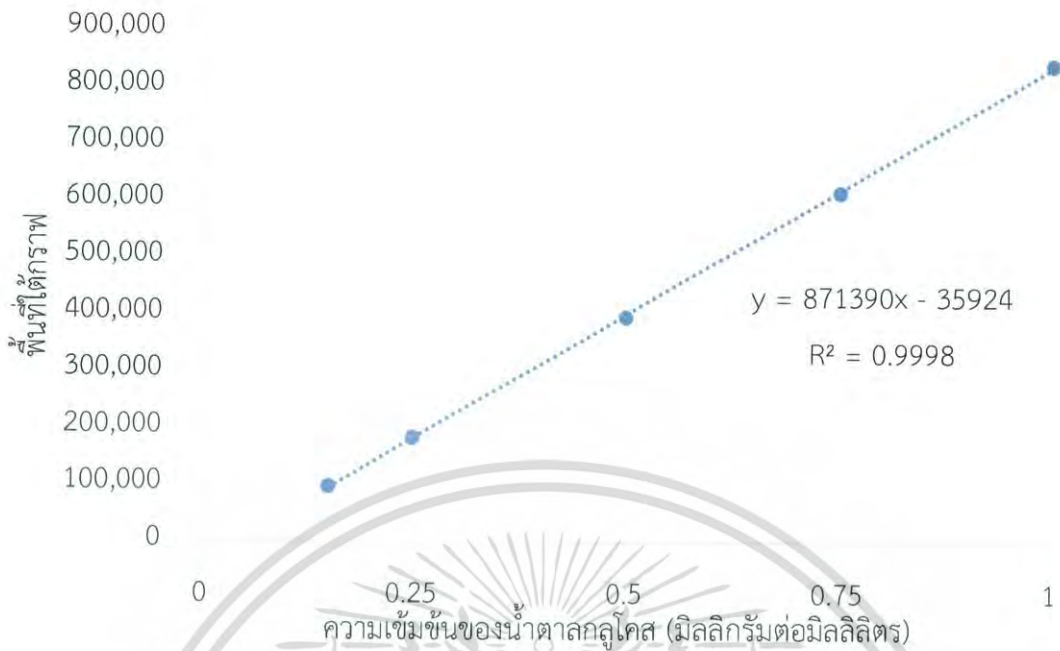
จากการวิเคราะห์กากน้ำตาลอ้อย โดยทำการเจือจางกากน้ำตาลอ้อยด้วยน้ำที่ปราศจากไอออนให้มีความเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตร จากนั้นทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography ; HPLC) ที่ศูนย์เครื่องมือคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง โดยการเทียบกับน้ำตาลมาตรฐาน 10 ชนิด ได้แก่ น้ำตาลซูโครส มอลโตส แล็กโตส กลูโคส โซโลส กาแล็กโตส แรมโนส แมนโนส ฟรุคโตส และอะราบิโนส พบว่ากากน้ำตาลอ้อย ยี่ห้อลิน บริษัท น้ำตาลไทยรุ่งเรือง จำกัด จังหวัดพิษณุโลก ประเทศไทย มีน้ำตาลอย่างน้อย 3 ชนิดเป็นองค์ประกอบ ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส ฟรุคโตส และซูโครส มีปริมาณเท่ากับ 78.3061, 131.4840 และ 296.2121 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งแสดงวิธีการคำนวณความเข้มข้นดังหัวข้อ ค.1.1 ค.1.2 และ ค.1.3

ค.1.1 การคำนวณความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสที่เป็นองค์ประกอบในกากน้ำตาลอ้อย ตารางที่ ค.1 แสดงพื้นที่ใต้กราฟและ ค่า Retention time เมื่อทำการวิเคราะห์น้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยเครื่อง HPLC ด้วยคอลัมน์วิเคราะห์ ชนิด BP-800 Ca++ Carbohydrate

ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	พื้นที่ใต้กราฟ	Retention time (นาที)
0.15	97,432	16.967
0.25	183,052	16.967
0.5	395,272	16.977
0.75	614,233	16.987
1	839,576	16.993
Retention time เฉลี่ย (นาที)		16.9782

จากนั้นสร้างกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส แสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้กราฟและความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) เพื่อหาสมการเส้นตรง ได้กราฟมาตรฐานดังรูปที่ ค.1

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ค.1 กราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคสสำหรับวิเคราะห์ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสที่เป็นองค์ประกอบของกากน้ำตาลอ้อย แสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้กราฟและความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

ตัวอย่างการคำนวณ

จากการวิเคราะห์ตัวอย่างกากน้ำตาลอ้อยความเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตร ทำการวิเคราะห์ 2 ซ้ำ โดยมีพื้นที่ใต้กราฟเท่ากับ 99,981 และ 101,112 เมื่อเทียบกับกราฟน้ำตาลกลูโคสมาตรฐาน แทนค่า $y = 99,981$ ในสมการเส้นตรง เพื่อหาความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส

$$\text{จากสมการเส้นตรง } y = 871,390x - 35,924$$

$$99,981 = 871,390x - 35,924$$

$$X = \frac{99,981 + 35,924}{871,390}$$

$$871,390$$

$$X = 0.155963 \text{ กรัมต่อลิตร}$$

โดยกากน้ำตาลอ้อยความเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตร เท่ากับ ความเข้มข้นร้อยละ 0.2

จากกากน้ำตาลอ้อยความเข้มข้นร้อยละ 0.2 มีน้ำตาลกลูโคส 0.155963 กรัมต่อลิตร

$$\text{กากน้ำตาลอ้อยความเข้มข้นร้อยละ } 100 = \frac{0.155963 \times 100}{0.2}$$

$$0.2$$

$$= 77.9815 \text{ กรัมต่อลิตร}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดังนั้น เมื่อเทียบกับกราฟน้ำตาลกลูโคสมาตรฐาน แทนค่า $y = 99,981$ ในสมการเส้นตรง ได้ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสเท่ากับ 77.9815 กรัมต่อลิตร

เมื่อเทียบกับกราฟน้ำตาลกลูโคสมาตรฐาน แทนค่า $y = 101,112$ ในสมการเส้นตรง ได้ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสเท่ากับ 78.6307 กรัมต่อลิตร

$$\begin{aligned} \text{กากน้ำตาลอ้อย 1 ลิตร มีน้ำตาลกลูโคส} &= \frac{77.9815 + 78.6307}{2} \\ &= 78.3061 \text{ กรัมต่อลิตร} \end{aligned}$$

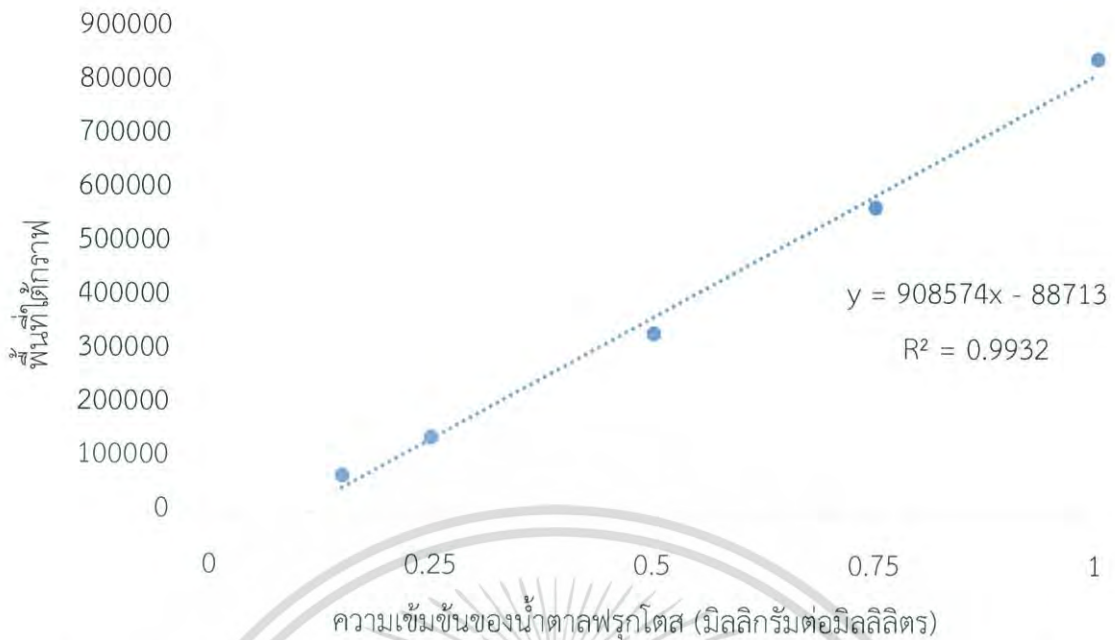
ดังนั้น ในกากน้ำตาลอ้อย 1 ลิตร มีน้ำตาลกลูโคส 78.3061 กรัมต่อลิตร

ค.1.2 การคำนวณความเข้มข้นของน้ำตาลฟรุคโตสที่เป็นองค์ประกอบในกากน้ำตาลอ้อย ตารางที่ ค.2 แสดงพื้นที่ใต้กราฟและ ค่า Retention time เมื่อทำการวิเคราะห์น้ำตาลฟรุคโตสที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยเครื่อง HPLC ด้วยคอลัมน์วิเคราะห์ ชนิด BP-800 Ca++ Carbohydrate

ความเข้มข้นของน้ำตาลฟรุคโตส (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	พื้นที่ใต้กราฟ	Retention time (นาที)
0.15	70,025	20.73
0.25	141,241	20.73
0.5	334,238	20.737
0.75	570,618	20.743
1	848,032	20.75
Retention time เฉลี่ย (นาที)		20.738

จากนั้นสร้างกราฟมาตรฐานน้ำตาลฟรุคโตส แสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้กราฟและความเข้มข้นของน้ำตาลฟรุคโตส (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) เพื่อหาสมการเส้นตรง ได้กราฟมาตรฐานดังรูปที่ ค.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ค.2 กราฟมาตรฐานน้ำตาลฟรุคโตสสำหรับวิเคราะห์ความเข้มข้นของน้ำตาลฟรุคโตสที่เป็นองค์ประกอบของกากน้ำตาลอ้อย แสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้กราฟและความเข้มข้นของน้ำตาลฟรุคโตส (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

ตัวอย่างการคำนวณ

จากการวิเคราะห์ตัวอย่างกากน้ำตาลอ้อยความเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตร ทำการวิเคราะห์ 2 ซ้ำ โดยมีพื้นที่ใต้กราฟเท่ากับ 150,890 และ 149,536 เมื่อเทียบกับกราฟน้ำตาลฟรุคโตสมาตรฐาน แทนค่า $y = 150,890$ ในสมการเส้นตรง เพื่อหาความเข้มข้นของน้ำตาลฟรุคโตส

$$\text{จากสมการเส้นตรง} \quad y = 908,574x - 88,713$$

$$150,890 = 908,574x - 88,713$$

$$x = \frac{150,890 + 88,713}{908,574}$$

$$x = 0.263713 \text{ กรัมต่อลิตร}$$

โดยกากน้ำตาลอ้อยความเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตร เท่ากับ ความเข้มข้นร้อยละ 0.2

จากกากน้ำตาลอ้อยความเข้มข้นร้อยละ 0.2 มีน้ำตาลฟรุคโตส 0.263713 กรัมต่อลิตร

$$\text{กากน้ำตาลอ้อยความเข้มข้นร้อยละ } 100 = \frac{0.263713 \times 100}{0.2}$$

$$= 131.8565 \text{ กรัมต่อลิตร}$$

ดังนั้น เมื่อเทียบกับกราฟน้ำตาลฟรุคโตสมาตรฐาน แทนค่า $y = 150,890$ ในสมการเส้นตรง

ได้ความเข้มข้นของน้ำตาลฟรุคโตสเท่ากับ 131.8565 กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารสงวนลิขสิทธิ์การเชิงงานเพื่อการศึกษเท่านั้น เมื่อนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อเทียบกับกราฟน้ำตาลฟรุคโตสมาตรฐาน แทนค่า $y = 149,536$ ในสมการเส้นตรง ได้ ความเข้มข้นของน้ำตาลฟรุคโตสเท่ากับ 131.1115 กรัมต่อลิตร

$$\begin{aligned} \text{กากน้ำตาลอ้อย 1 ลิตร มีน้ำตาลฟรุคโตส} &= \frac{131.8565 + 131.1115}{2} \\ &= 131.4840 \text{ กรัมต่อลิตร} \end{aligned}$$

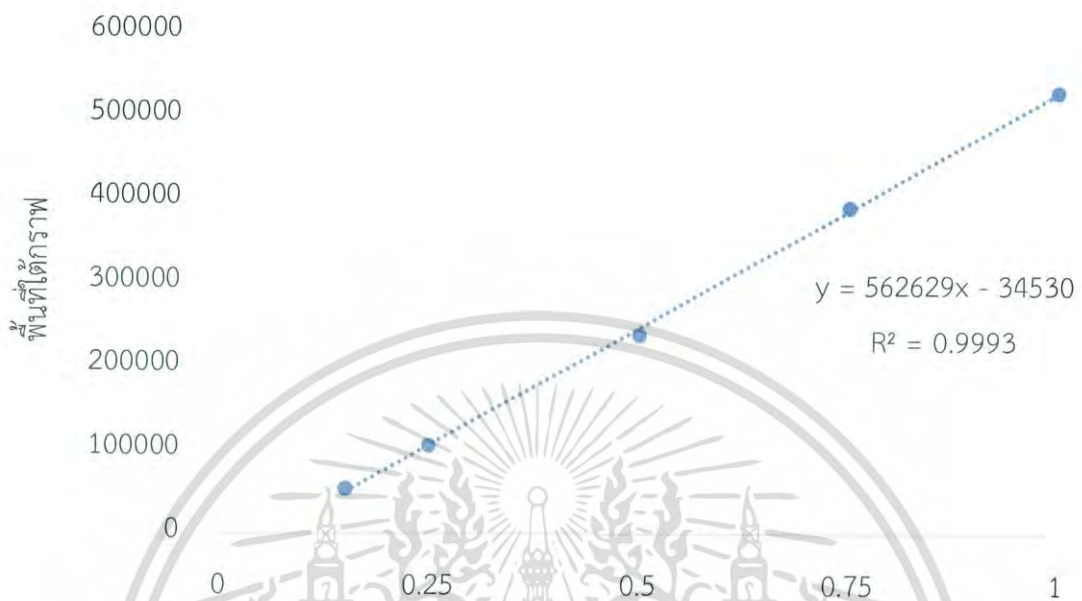
ดังนั้น ในกากน้ำตาลอ้อย 1 ลิตร มีน้ำตาลฟรุคโตส 131.4840 กรัมต่อลิตร

ค.1.3 การคำนวณความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสที่เป็นองค์ประกอบในกากน้ำตาลอ้อย ตารางที่ ค.3 แสดงพื้นที่ใต้กราฟและ ค่า Retention time เมื่อทำการวิเคราะห์น้ำตาลซูโครสที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยเครื่อง HPLC ด้วยคอลัมน์วิเคราะห์ ชนิด BP-800 Ca++ Carbohydrate

ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	พื้นที่ใต้กราฟ	Retention time (นาที)
0.15	53,882	14.443
0.25	106,075	14.447
0.5	238,237	14.457
0.75	391,029	14.467
1	529,091	14.477
Retention time เฉลี่ย (นาที)		14.4582

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากนั้นสร้างกราฟมาตรฐานน้ำตาลซูโครส แสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้กราฟและความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) เพื่อหาสมการเส้นตรง ได้กราฟมาตรฐานดังรูปที่ ค.3



รูปที่ ค.3 กราฟมาตรฐานน้ำตาลซูโครสสำหรับวิเคราะห์ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสที่เป็นองค์ประกอบของกากน้ำตาลอ้อย แสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้กราฟและความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

ตัวอย่างการคำนวณ

จากการวิเคราะห์ตัวอย่างกากน้ำตาลอ้อยความเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตร ทำการวิเคราะห์ 2 ซ้ำ โดยมีพื้นที่ใต้กราฟเท่ากับ 297,116 และ 300,454 เมื่อเทียบกับกราฟน้ำตาลซูโครสมาตรฐาน แทนค่า $y = 297,116$ ในสมการเส้นตรง เพื่อหาความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส

$$\begin{aligned} \text{จากสมการเส้นตรง} \quad y &= 562,629x - 34,530 \\ 297,116 &= 562,629x - 34,530 \\ X &= \frac{297,116 + 34,530}{562,629} \\ X &= 0.589458 \text{ กรัมต่อลิตร} \end{aligned}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยจากน้ำตาลอ้อยความเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตร เท่ากับ ความเข้มข้นร้อยละ 0.2

จากจากน้ำตาลอ้อยความเข้มข้นร้อยละ 0.2 มีน้ำตาลซูโครส 0.589458 กรัมต่อลิตร

$$\text{จากน้ำตาลอ้อยความเข้มข้นร้อยละ } 100 = \frac{0.589458 \times 100}{0.2}$$

$$= 294.7289 \text{ กรัมต่อลิตร}$$

ดังนั้น เมื่อเทียบกับกราฟน้ำตาลซูโครสมาตรฐาน แทนค่า $y = 297,116$ ในสมการเส้นตรง ได้ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสเท่ากับ 294.7289 กรัมต่อลิตร

เมื่อเทียบกับกราฟน้ำตาลซูโครสมาตรฐาน แทนค่า $y = 300,454$ ในสมการเส้นตรง ได้ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสเท่ากับ 297.6953 กรัมต่อลิตร

$$\text{จากน้ำตาลอ้อย 1 ลิตร มีน้ำตาลซูโครส} = \frac{294.7289 + 297.6953}{2}$$

$$= 296.2121 \text{ กรัมต่อลิตร}$$

ดังนั้น ในจากน้ำตาลอ้อย 1 ลิตร มีน้ำตาลซูโครส 296.2121 กรัมต่อลิตร

ค.2 การคำนวณหาปริมาณแคลเซียมมาเลตด้วยวิธีการไทเทรต (FAO, 2006)

EDTA ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เท่ากับแคลเซียมมาเลต 8.607 มิลลิกรัม

$$\text{จากสูตร} \quad \frac{\text{น้ำหนักตะกอนทั้งหมด (กรัม)} \times \text{ปริมาณ EDTA ที่ใช้ (มิลลิลิตร)} \times 8.607}{\text{น้ำหนักตะกอนที่ใช้ไทเทรต (มิลลิกรัม)}}$$

ตัวอย่างการคำนวณ

ปริมาตรน้ำหมัก 150 มิลลิลิตร ตักตะกอนแคลเซียมมาเลตได้ทั้งหมด 8.070 กรัม

น้ำหนักตะกอนที่ใช้ไทเทรต 0.2000 กรัม

ปริมาณ EDTA ที่ใช้จนถึงจุดยุติ 4.4 มิลลิลิตร

$$\text{จาก EDTA ปริมาตร 1 มิลลิลิตร} = \text{แคลเซียมมาเลต 8.607 มิลลิกรัม}$$

$$\text{ปริมาณ EDTA 4.4 มิลลิลิตร} = \frac{8.607 \times 4.4}{1}$$

$$= 37.87 \text{ มิลลิกรัม}$$

จากน้ำหนักตะกอน 0.2000 กรัม มีตะกอนแคลเซียมมาเลต 37.87 มิลลิกรัม

$$\text{ตะกอนตัวอย่างทั้งหมด 8.070 กรัม} = \frac{37.87 \times 8.070}{0.2000}$$

$$= 1,528.05 \text{ มิลลิกรัม}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น 1,528.05 มิลลิกรัม ใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$$\begin{aligned} \text{จากน้ำหมักปริมาตร } 150 \text{ มิลลิลิตร มีตะกอนแคลเซียมมาเลด } 1,528.05 \text{ มิลลิกรัม} \\ \text{ปริมาตรน้ำหมัก } 1,000 \text{ มิลลิลิตร} &= \frac{1,528.05 \times 1000}{150} \end{aligned}$$

$$= 10,187 \text{ มิลลิกรัม}$$

ดังนั้น มีปริมาณแคลเซียมมาเลดทั้งหมด 10,187 มิลลิกรัมต่อลิตร

เปลี่ยนหน่วยจากมิลลิกรัมต่อลิตร เป็นกรัมต่อลิตร

$$\text{จาก } 1000 \text{ มิลลิกรัม} = 1 \text{ กรัม}$$

$$10,187 \text{ มิลลิกรัม} = 10,187 \times 1$$

$$\frac{\quad}{1,000}$$

$$= 10.19 \text{ กรัม}$$

ดังนั้น มีปริมาณแคลเซียมมาเลดทั้งหมด 10.19 กรัมต่อลิตร

การคำนวณผลได้ (Yield)

$$\text{จากสูตร ผลได้ (กรัมต่อกรัมน้ำตาล)} = \frac{\text{ปริมาณแคลเซียมมาเลดทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)}}{\text{ปริมาณน้ำตาลที่ใช้ (กรัมต่อลิตร)}}$$

การคำนวณอัตราการผลิต (Productivity)

$$\text{จากสูตร อัตราการผลิต (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)} = \frac{\text{ปริมาณแคลเซียมมาเลดทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)}}{\text{เวลา (ชั่วโมง)}}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค.4 แสดงปริมาณน้ำตาลที่เหลือ ปริมาณแคลเซียมมาเลต ผลได้ และอัตราการผลิต เมื่อทำการเพาะเลี้ยง *Acetobacter* sp. BX2 โดยใช้น้ำตาล กลูโคส และฟรุกโตสเป็นแหล่งคาร์บอน ตามลำดับ

แหล่งคาร์บอน	วันที่	ระดับการเจือจาง	ค่าดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร			OD เฉลี่ย	ความเข้มข้นน้ำตาล (กรัมต่อลิตร)			[น้ำตาล] เฉลี่ย	SD	[น้ำตาล] ± SD	น้ำตาลที่ถูกใช้ (กรัมต่อลิตร)	แคลเซียมมาเลต(กรัมต่อลิตร)	แคลเซียมมาเลต (กรัมต่อลิตร)	ผลได้ (กรัมต่อกรัม น้ำตาล)	อัตราการผลิต (กรัมต่อลิตร ต่อชั่วโมง)
			I	II	III		I	II	III								
			น้ำตาลกลูโคส	0	100		0.673	0.678	0.680								
1	100	0.251		0.253	0.251	0.252	31.38	31.63	31.38	31.46	0.14	31.46 ± 0.14	14.71	14.71 ± 0.19			
2	5	0.224		0.224	0.240	0.229	1.40	1.40	1.50	1.43	0.06	1.43 ± 0.06	30.44	30.44 ± 0.62			
3	2	0.437		0.405	0.421	0.421	1.09	1.01	1.05	1.05	0.04	1.05 ± 0.04	31.68	31.68 ± 0.41			
4	2	0.397		0.421	0.426	0.415	0.99	1.05	1.07	1.04	0.04	1.04 ± 0.04	32.45	32.45 ± 0.53			
5	2	0.312		0.385	0.348	0.348	0.78	0.96	0.87	0.87	0.09	0.87 ± 0.09	34.87	34.87 ± 0.19			
น้ำตาลฟรุกโตส	0	100	0.583	0.588	0.576	0.582	72.88	73.50	72.00	72.79	0.75	72.79 ± 0.75	11.46	1.73	1.73 ± 0.19	0.22	0.002
	1	100	0.547	0.543	0.555	0.548	68.38	67.88	69.38	68.54	0.76	68.54 ± 0.76		1.93	1.93 ± 0.24		
	2	100	0.529	0.521	0.524	0.525	66.13	65.13	65.50	65.58	0.51	65.58 ± 0.51		2.88	2.88 ± 0.23		
	3	100	0.520	0.516	0.514	0.517	65.00	64.50	64.25	64.58	0.38	64.58 ± 0.38		3.75	3.75 ± 0.58		
	4	100	0.502	0.508	0.501	0.504	62.75	63.50	62.63	62.96	0.47	62.96 ± 0.47		2.60	2.60 ± 0.28		
	5	100	0.494	0.484	0.494	0.491	61.75	60.50	61.75	61.33	0.72	61.33 ± 0.72		2.49	2.49 ± 0.31		

ตารางที่ ค.5 แสดงปริมาณน้ำตาลซูโครสที่เหลือ ปริมาณแคลเซียมมาเลต ผลได้ และอัตราการผลิต เมื่อทำการเพาะเลี้ยง *Acetobacter* sp. BX2 โดยใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน

แหล่งคาร์บอน	วันที่	ระดับความเจือจาง	ค่าดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตร			OD เฉลี่ย	ความเข้มข้นน้ำตาล (กรัมต่อลิตร)			[น้ำตาล] เฉลี่ย	SD	[น้ำตาล] ± SD	น้ำตาลที่ถูกใช้	แคลเซียมมาเลต(กรัมต่อลิตร)	แคลเซียมมาเลต (กรัมต่อลิตร)	ผลได้ (กรัมต่อกรัม น้ำตาล)	อัตราการผลิต (กรัมต่อลิตร ต่อชั่วโมง)
			I	II	III		I	II	III								
			น้ำตาลซูโครส	0	3000		0.408	0.4	0.398								
1	3000	0.398		0.388	0.4	0.395	91.85	89.54	92.31	91.23	1.48	91.23 ± 1.48	5.33	5.33 ± 0.28			
2	2000	0.558		0.578	0.548	0.561	85.85	88.92	84.31	86.36	2.35	86.36 ± 2.35	5.44	5.44 ± 0.40			
3	2000	0.512		0.534	0.531	0.526	78.77	82.15	81.69	80.87	1.84	80.87 ± 1.84	5.90	5.90 ± 0.86			
4	2000	0.456		0.478	0.495	0.476	70.15	73.54	76.15	73.28	3.01	73.28 ± 3.01	5.37	5.37 ± 0.09			
5	2000	0.433		0.456	0.479	0.456	66.62	70.15	73.69	70.15	3.54	70.15 ± 3.54	3.54	3.54 ± 0.23			

ตารางที่ ค.6 แสดงปริมาณน้ำตาลรีเวิร์ชที่เหลือ ปริมาณแคลเซียมมาเลต ผลได้ และอัตราการผลิต เมื่อทำการเพาะเลี้ยง *Acetobacter* sp. BX2 โดยใช้กากน้ำตาล อ้อยที่ปรับสภาพด้วยวิธีต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอน

แหล่งคาร์บอน	วันที่	ระดับการ เจือจาง	ค่าดูดกลืนแสงที่ 540			OD เฉลี่ย	ความเข้มข้นน้ำตาล (กรัมต่อลิตร)			[น้ำตาล] เฉลี่ย	SD	[น้ำตาล] ± SD	น้ำตาลที่ถูกใช้ (กรัมต่อลิตร)	แคลเซียมมาเลต (กรัมต่อลิตร)	ผลได้ (กรัมต่อกรัม น้ำตาล)	อัตราการผลิต (กรัมต่อลิตรต่อ ชั่วโมง)
			นาโนเมตร				I	II	III							
			I	II	III											
กากน้ำตาลอ้อย ไม่ปรับสภาพ	0	100	0.628	0.624	0.639	0.630	78.50	78.00	79.88	78.79	0.97	78.79 ± 0.97	39.42	20.34 ± 1.24	0.52	0.1211
	1	100	0.592	0.610	0.607	0.603	74.00	76.25	75.88	75.38	1.21	75.38 ± 1.21				
	2	100	0.499	0.465	0.482	0.482	62.38	58.13	60.25	60.25	2.13	60.25 ± 2.13				
	3	100	0.413	0.427	0.433	0.424	51.63	53.38	54.13	53.04	1.28	53.04 ± 1.28				
	4	100	0.395	0.395	0.406	0.399	49.38	49.38	50.75	49.83	0.79	49.83 ± 0.79				
	5	100	0.360	0.365	0.368	0.364	45.00	45.63	46.00	45.54	0.51	45.54 ± 0.51				
	6	100	0.301	0.315	0.329	0.315	37.63	39.38	41.13	39.38	1.75	39.38 ± 1.75				
ปรับสภาพด้วยกรด ซัลฟิวริก	0	100	0.697	0.701	0.709	0.702	87.13	87.63	88.63	87.79	0.76	87.79 ± 0.76	36.75	18.14 ± 0.72	0.49	0.1080
	1	100	0.601	0.630	0.633	0.621	75.13	78.75	79.13	77.67	2.21	77.67 ± 2.21				
	2	100	0.499	0.488	0.500	0.496	62.38	61.00	62.50	61.96	0.83	61.96 ± 0.83				
	3	100	0.456	0.468	0.458	0.461	57.00	58.50	57.25	57.58	0.80	57.58 ± 0.80				
	4	100	0.428	0.438	0.420	0.426	53.50	54.75	52.50	53.58	1.13	54.92 ± 1.51				
	5	100	0.411	0.421	0.421	0.418	51.38	52.63	52.63	52.21	0.72	52.21 ± 0.72				
	6	100	0.400	0.415	0.410	0.408	50.00	51.88	51.25	51.04	0.95	51.04 ± 0.95				
ปรับสภาพด้วย ถ่านกัมมันต์	0	100	0.740	0.744	0.737	0.740	92.50	93.00	92.13	92.54	0.44	92.54 ± 0.44	39.46	16.05 ± 0.79	0.41	0.0955
	1	100	0.650	0.644	0.629	0.641	81.25	80.50	78.63	80.13	1.35	80.13 ± 1.35				
	2	100	0.518	0.488	0.493	0.500	64.75	61.00	61.63	62.46	2.01	62.46 ± 2.01				
	3	100	0.466	0.462	0.461	0.463	58.25	57.75	57.63	57.88	0.33	57.88 ± 0.33				
	4	100	0.456	0.449	0.471	0.459	57.00	56.13	58.88	57.33	1.40	57.33 ± 1.40				
	5	100	0.422	0.422	0.433	0.426	52.75	52.75	54.13	53.21	0.79	53.21 ± 0.79				
	6	100	0.432	0.421	0.421	0.425	54.00	52.63	52.63	53.08	0.79	53.08 ± 0.79				

ตารางที่ ค.6 (ต่อ) แสดงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ ปริมาณแคลเซียมมาเลต ผลได้ และอัตราการผลิต เมื่อทำการเพาะเลี้ยง *Acetobacter* sp. BX2 โดยใช้กากน้ำตาลที่ปรับสภาพด้วยวิธีต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอน

แหล่งคาร์บอน	วันที่	ระดับการ เจือจาง	ค่าดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร			OD เฉลี่ย	ความเข้มข้นน้ำตาล (กรัมต่อลิตร)			[น้ำตาล] เฉลี่ย	SD	[น้ำตาล] ± SD	น้ำตาลที่ถูกใช้ (กรัมต่อลิตร)	แคลเซียมมาเลต (กรัมต่อลิตร)	ผลได้ (กรัมต่อกรัม น้ำตาล)	อัตราการผลิต (กรัมต่อลิตร ต่อชั่วโมง)
			I	II	III		I	II	III							
ปรับสภาพด้วย แคลเซียมไฮดรอกไซด์	0	100	0.789	0.788	0.793	0.790	98.63	98.50	99.13	98.75	0.33	98.75±0.33	36.92	18.42 ± 0.74	0.50	0.1096
	1	100	0.735	0.728	0.701	0.721	91.88	91.00	87.63	90.17	2.24	90.17±2.24				
	2	100	0.642	0.675	0.634	0.650	80.25	84.38	79.25	81.29	2.72	81.29±2.72				
	3	100	0.612	0.617	0.629	0.619	76.50	77.13	78.63	77.42	1.09	77.42±1.09				
	4	100	0.584	0.562	0.547	0.564	73.00	70.25	68.38	70.54	2.33	70.54±2.33				
	5	100	0.543	0.563	0.545	0.550	67.88	70.38	68.13	68.79	1.38	68.79±1.38				
	6	100	0.498	0.487	0.499	0.495	62.25	60.88	62.38	61.83	0.83	61.83±0.83				
ปรับสภาพด้วย โพแทสเซียม เพอโรซายาไนต์	0	100	0.660	0.654	0.662	0.659	82.50	81.75	82.75	82.33	0.52	82.33±0.52	32.08	15.54 ± 1.51	0.48	0.0925
	1	100	0.652	0.658	0.654	0.655	81.50	82.25	81.75	81.83	0.38	81.83±0.38				
	2	100	0.623	0.613	0.658	0.631	77.88	76.63	82.25	78.92	2.95	78.92±2.95				
	3	100	0.578	0.534	0.524	0.545	72.25	66.75	65.50	68.17	3.59	68.71±3.59				
	4	100	0.422	0.424	0.412	0.419	52.75	53.00	51.50	52.42	0.80	52.42±0.80				
	5	100	0.412	0.423	0.422	0.419	51.50	52.88	52.75	52.38	0.76	52.38±0.76				
	6	100	0.399	0.397	0.410	0.402	49.88	49.63	51.25	50.25	0.87	50.25±0.87				
ปรับสภาพด้วยกรด ซัลฟูริกและ แคลเซียมไฮดรอกไซด์	0	100	0.798	0.799	0.800	0.799	99.75	99.88	100.00	99.88	0.12	99.88±0.12	43.38	24.20 ± 1.46	0.56	0.1440
	1	100	0.753	0.713	0.744	0.737	94.13	89.13	93.00	92.08	2.62	92.08±2.62				
	2	100	0.598	0.581	0.608	0.596	74.75	72.63	76.00	74.46	1.71	74.46±1.71				
	3	100	0.575	0.569	0.574	0.573	71.88	71.13	71.75	71.58	0.40	71.58±0.40				
	4	100	0.508	0.501	0.506	0.505	63.50	62.63	63.25	63.13	0.45	63.13±0.45				
	5	100	0.49	0.481	0.461	0.477	61.00	60.13	57.63	59.58	1.75	59.58±1.75				
	6	100	0.444	0.455	0.457	0.452	55.50	56.88	57.13	56.50	0.88	56.50±0.88				

ตารางที่ ค.7 แสดงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ ปริมาณแคลเซียมมาเลต ผลได้ และอัตราการผลิต เมื่อทำการเพาะเลี้ยง *Acetobacter* sp. BX2 โดยใช้กากน้ำตาลอ้อยที่ปรับสภาพด้วย กรดซัลฟูริกและแคลเซียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันเป็นแหล่งคาร์บอน

แหล่งคาร์บอน (กรัมต่อลิตร)	วันที่	ระดับการ เจือจาง	ค่าดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร			OD เฉลี่ย	ความเข้มข้นน้ำตาล (กรัมต่อลิตร)			[น้ำตาล] เฉลี่ย	SD	[น้ำตาล] ± SD	น้ำตาลที่ถูก ใช้ (กรัมต่อ ลิตร)	แคลเซียมมา เลต (กรัมต่อ ลิตร)	ผลได้ (กรัมต่อกรัม น้ำตาล)	อัตราการผลิต (กรัมต่อลิตร ต่อชั่วโมง)
			I	II	III		I	II	III							
ความเข้มข้น 50	0	50	0.675	0.673	0.666	0.671	42.19	42.06	41.63	41.96	0.30	41.96 ± 0.30	19.19	9.40 ± 1.95	0.49	0.07
	1	50	0.599	0.621	0.628	0.616	37.44	38.81	39.25	38.50	0.95	38.50 ± 0.95				
	2	50	0.527	0.562	0.578	0.556	32.94	35.13	36.13	34.73	1.63	29.71 ± 1.63				
	3	50	0.487	0.473	0.466	0.475	30.44	29.56	29.13	29.71	0.67	29.7 ± 0.67				
	4	50	0.421	0.423	0.406	0.417	26.31	26.44	25.38	26.04	0.58	26.4 ± 0.58				
	5	50	0.360	0.365	0.368	0.364	22.50	22.81	23.00	22.77	0.25	22.77 ± 0.25				
ความเข้มข้น 100	0	200	0.455	0.455	0.444	0.451	113.75	113.75	111.00	112.83	1.59	112.83 ± 1.59	36.67	25.51 ± 3.55	0.70	0.18
	1	200	0.427	0.438	0.427	0.431	106.75	109.50	106.75	107.67	1.59	107.67 ± 1.59				
	2	200	0.397	0.401	0.412	0.403	99.25	100.25	103.00	100.83	1.94	100.83 ± 1.94				
	3	200	0.385	0.378	0.377	0.380	96.25	94.50	94.25	95.00	1.09	95.00 ± 1.09				
	4	200	0.333	0.329	0.321	0.426	83.25	82.25	80.25	81.92	1.53	81.92 ± 1.53				
	5	200	0.306	0.309	0.299	0.305	76.50	77.25	74.75	76.17	1.28	76.17 ± 1.28				
ความเข้มข้น 150	0	200	0.556	0.564	0.566	0.562	139.00	141.00	141.50	140.50	1.32	140.50 ± 1.32	87.92	30.75 ± 0.39	0.35	0.21
	1	200	0.478	0.488	0.480	0.482	119.50	122.00	120.00	120.50	1.32	120.50 ± 1.32				
	2	200	0.366	0.377	0.378	0.374	91.50	94.25	94.50	93.42	1.66	93.42 ± 1.66				
	3	200	0.307	0.315	0.329	0.317	76.75	78.75	82.25	79.25	2.78	79.25 ± 2.78				
	4	200	0.277	0.286	0.289	0.426	69.25	71.50	72.25	71.00	1.56	71.00 ± 1.56				
	5	200	0.205	0.211	0.215	0.210	51.25	52.75	53.75	52.58	1.26	52.58 ± 1.26				
ความเข้มข้น 200	0	200	0.787	0.782	0.776	0.782	196.75	195.50	194.00	195.42	1.38	195.42 ± 1.38	111.33	40.27 ± 1.60	0.36	0.28
	1	200	0.666	0.647	0.652	0.655	166.50	161.75	163.00	163.75	2.46	163.75 ± 2.46				
	2	200	0.569	0.556	0.595	0.573	142.25	139.00	148.75	143.33	4.96	143.33 ± 4.96				
	3	200	0.416	0.417	0.396	0.410	104.00	104.25	99.00	102.42	2.96	102.42 ± 2.13				
	4	200	0.369	0.377	0.360	0.426	92.25	94.25	90.00	92.17	2.13	92.17 ± 2.13				
	5	200	0.325	0.344	0.340	0.336	81.25	86.00	85.00	84.08	2.50	84.08 ± 2.50				

ตารางที่ ค.8 แสดงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ ปริมาณแคลเซียมมาเลต ผลได้ และอัตราการผลิต เมื่อทำการเพาะเลี้ยง *Acetobacter* sp. BX2 โดยใช้ corn steep liquor ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันเป็นแหล่งไนโตรเจน

แหล่งไนโตรเจน	วันที่	ระดับการ เจือจาง	ค่าดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร			OD เฉลี่ย	ความเข้มข้นน้ำตาล (กรัมต่อลิตร)			[น้ำตาล] เฉลี่ย	SD	[น้ำตาล] ± SD	น้ำตาลที่ถูกใช้ (กรัมต่อลิตร)	แคลเซียมมาเลต (กรัมต่อลิตร)	ผลได้ (กรัมต่อกรัม น้ำตาล)	อัตราการผลิต (กรัม ต่อลิตรต่อชั่วโมง)
			I	II	III		I	II	III							
			0	0	200		0.767	0.769	0.793							
1	200	0.760	0.759	0.767	0.762	190.00	189.75	191.75	190.50	1.09	190.50 ± 1.09					
2	200	0.688	0.687	0.690	0.688	172.00	171.75	172.50	172.08	0.38	172.08 ± 0.38					
3	200	0.582	0.575	0.570	0.576	145.50	143.75	142.50	143.92	1.51	143.92 ± 1.51					
4	200	0.506	0.500	0.510	0.505	126.50	125.00	127.50	126.33	1.26	126.33 ± 1.26					
5	200	0.430	0.437	0.438	0.435	107.50	109.25	109.50	108.75	1.09	108.75 ± 1.09					
6	200	0.421	0.419	0.422	0.421	105.25	104.75	105.50	105.17	0.38	105.17 ± 0.38					
0.25	0	200	0.790	0.788	0.790	0.789	197.50	197.00	197.50	197.33	0.29	197.33 ± 0.29	98.08	38.25 ± 0.88	0.39	0.002
	1	200	0.768	0.770	0.772	0.770	192.00	192.50	193.00	192.50	0.50	192.50 ± 0.50				
	2	200	0.688	0.698	0.687	0.691	172.00	174.50	171.75	172.75	1.52	172.75 ± 1.52				
	3	200	0.580	0.576	0.578	0.578	145.00	144.00	144.50	144.50	0.50	144.50 ± 0.50				
	4	200	0.465	0.458	0.460	0.461	116.25	114.50	115.00	115.25	0.90	115.25 ± 0.90				
	5	200	0.409	0.410	0.413	0.411	102.25	102.50	103.25	102.67	0.52	102.67 ± 0.52				
	6	200	0.399	0.394	0.398	0.397	99.75	98.50	99.50	99.25	0.66	99.25 ± 0.66				
0.5	0	200	0.788	0.785	0.789	0.787	197.00	196.25	197.25	196.83	0.52	196.83 ± 0.52	111.50	37.49 ± 0.55	0.34	0.002
	1	200	0.770	0.778	0.774	0.774	192.50	194.50	193.50	193.50	1.00	193.50 ± 1.00				
	2	200	0.688	0.693	0.690	0.690	172.00	173.25	172.50	172.58	0.63	172.58 ± 0.63				
	3	200	0.591	0.587	0.588	0.589	147.75	146.75	147.00	147.17	0.52	147.17 ± 0.52				
	4	200	0.469	0.470	0.472	0.470	117.25	117.50	118.00	117.58	0.38	117.58 ± 0.38				
	5	200	0.398	0.390	0.396	0.395	99.50	97.50	99.00	98.67	1.04	98.67 ± 1.04				
	6	200	0.339	0.345	0.34	0.341	84.75	86.25	85.00	85.33	0.80	85.33 ± 0.80				

ตารางที่ ค.8 (ต่อ) แสดงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ ปริมาณแคลเซียมมาเลต ผลได้ และอัตราการผลิต เมื่อทำการเพาะเลี้ยง *Acetobacter* sp. BX2 โดยใช้ corn steep liquor ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันเป็นแหล่งไนโตรเจน

แหล่ง ไนโตรเจน	วันที่	ระดับ การเจือ จาง	ค่าดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร			OD เฉลี่ย	ความเข้มข้นน้ำตาล (กรัมต่อลิตร)			[น้ำตาล] เฉลี่ย	SD	[น้ำตาล] ± SD	น้ำตาลที่ถูกใช้ (กรัมต่อลิตร)	แคลเซียมมาเลต (กรัมต่อลิตร)	ผลได้ (กรัมต่อกรัม น้ำตาล)	อัตราการผลิต (กรัมต่อลิตรต่อ ชั่วโมง)
			I	II	III		I	II	III							
			0.75	0	200		0.799	0.798	0.792							
1	200	0.779	0.787	0.786	0.784	194.75	196.75	196.50	196.00	1.09	196.00 ± 1.09					
2	200	0.695	0.699	0.690	0.695	173.75	174.75	172.50	173.67	1.13	173.67 ± 1.13					
3	200	0.583	0.579	0.580	0.581	145.75	144.75	145.00	145.17	0.52	145.17 ± 0.52					
4	200	0.489	0.494	0.493	0.492	122.25	123.50	123.25	123.00	0.66	123.00 ± 0.66					
5	200	0.443	0.449	0.450	0.447	110.75	112.25	112.50	111.83	0.95	111.83 ± 0.95					
6	200	0.4	0.404	0.394	0.399	100.00	101.00	98.50	99.83	1.26	99.83 ± 1.26					
1	0	200	0.789	0.794	0.790	0.791	197.25	198.50	197.50	197.75	0.66	197.75 ± 0.66	87.17	32.52 ± 1.01	0.37	0.002
1	200	0.767	0.769	0.771	0.769	191.75	192.25	192.75	192.25	0.50	192.25 ± 0.50					
2	200	0.696	0.690	0.699	0.695	174.00	172.50	174.75	173.75	1.15	173.75 ± 1.15					
3	200	0.583	0.578	0.577	0.579	145.75	144.50	144.25	144.83	0.80	144.83 ± 0.80					
4	200	0.530	0.533	0.529	0.531	132.50	133.25	132.25	132.67	0.52	132.67 ± 0.52					
5	200	0.486	0.478	0.485	0.483	121.50	119.50	121.25	120.75	1.09	120.75 ± 1.09					
6	200	0.443	0.445	0.439	0.442	110.75	111.25	109.75	110.58	0.76	110.58 ± 0.76					

ตารางที่ ค.9 แสดงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ ปริมาณแคลเซียมมาเลต ผลได้ และอัตราการผลิต เมื่อทำการเพาะเลี้ยง *Acetobacter* sp. BX2 โดยใช้กากน้ำตาล อ้อยที่ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกและแคลเซียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้น 200 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และใช้ corn steep liquor ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.25 โดยปริมาตร เป็นแหล่งไนโตรเจน

วันที่	ระดับการ เจือจาง	ค่าดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร			OD เฉลี่ย	ความเข้มข้นน้ำตาล (กรัมต่อลิตร)			[น้ำตาล] เฉลี่ย	SD	[น้ำตาล] ± SD	น้ำตาลที่ถูกใช้ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณ แคลเซียมมาเลต (กรัมต่อลิตร)	แคลเซียม มาเลต (กรัมต่อลิตร)	ผลได้ (กรัมต่อกรัม น้ำตาล)	อัตราการผลิต (กรัมต่อลิตรต่อ ชั่วโมง)
		I	II	III		I	II	III								
		0	200	0.790		0.785	0.792	0.789								
1	200	0.766	0.764	0.760	0.763	191.50	191.00	190.00	190.83	0.76	190.83 ± 0.76	6.42	5.86	5.86 ± 0.63	0.91 ± 0.03	0.24 ± 0.03
2	200	0.689	0.691	0.684	0.688	172.25	172.75	171.00	172.00	0.90	172.00 ± 0.90	25.25	23.43	23.43 ± 0.72	0.93 ± 0.02	0.49 ± 0.01
3	200	0.565	0.570	0.572	0.569	141.25	142.50	143.00	142.25	0.90	142.25 ± 0.90	55.00	33.81	33.81 ± 0.90	0.61 ± 0.02	0.47 ± 0.01
4	200	0.432	0.436	0.433	0.434	108.00	109.00	108.25	108.42	0.52	108.42 ± 0.52	88.83	37.23	37.23 ± 0.69	0.42 ± 0.01	0.39 ± 0.01
5	200	0.382	0.392	0.389	0.388	95.50	98.00	97.25	96.92	1.28	96.92 ± 1.28	100.33	38.52	38.52 ± 1.08	0.38 ± 0.01	0.32 ± 0.01

ภาคผนวก ง
การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

ตารางที่ ง.1 แสดงการวิเคราะห์ค่าทางสถิติของปริมาณแคลเซียมมาเลต ผลได้ และอัตราการผลิตด้วย *Acetobacter* sp. BX2 โดยใช้น้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบของกากน้ำตาลอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอน

ANOVA						
		DF	Sum of squares	Mean Squares	F-Value	P-Value
ปริมาณแคลเซียมมาเลต	แหล่งคาร์บอน	2	1812.600	906.300	17.950	0.000
	Error	15	757.400	50.490		
	Total	17	2570.000			
ผลได้	แหล่งคาร์บอน	2	0.02792	0.013958	1.43	0.270
	Error	15	0.14616	0.009744		
	Total	17	0.17408			
อัตราการผลิต	แหล่งคาร์บอน	2	0.000001	0.000001	1.43	0.207
	Error	15	0.000007	0.000000		
	Total	17	0.000008			

ตารางที่ ง.2 แสดงการเปรียบเทียบปริมาณแคลเซียมมาเลต ผลได้ และอัตราการผลิตด้วย *Acetobacter* sp. BX2 โดยใช้น้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบของกากน้ำตาลอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอน ด้วยวิธีของ Duncan ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

แหล่งคาร์บอน	ปริมาณแคลเซียมมาเลต (กรัมต่อลิตร)			ผลได้ (กรัมต่อกรัมน้ำตาล)			อัตราการผลิต (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)		
	N	Mean	Grouping	N	Mean	Grouping	N	Mean	Grouping
กลูโคส	6	24.81	A	6	0.2962	A	6	0.002057	A
ฟรุกโตส	6	4.633	B	6	0.2237	A	6	0.001554	A
ซูโครส	6	2.563	B	6	0.2049	A	6	0.001423	A

ตารางที่ ง.3 แสดงการวิเคราะห์ค่าทางสถิติของปริมาณแคลเซียมมาเลต ผลได้ และอัตราการผลิต
ด้วย *Acetobacter* sp. BX2 โดยใช้กากน้ำตาลที่อ้อยไม่ปรับสภาพและกากน้ำตาลอ้อยที่ปรับ
สภาพด้วยวิธีต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอน

ANOVA						
		DF	Sum of squares	Mean Squares	F-Value	P-Value
ปริมาณ แคลเซียมมา เลต	วิธีการปรับสภาพ	5	150.89	30.178	23.71	0.000
	Error	12	15.27	1.273		
	Total	17	166.16			
ผลได้	วิธีการปรับสภาพ	5	0.03688	0.007377	8.01	0.002
	Error	12	0.01105	0.000921		
	Total	17	0.04794			
อัตราการ ผลิต	วิธีการปรับสภาพ	5	0.005346	0.001069	23.71	0.000
	Error	12	0.000541	0.000045		
	Total	17	0.005887			

ตารางที่ ง.4 แสดงการวิเคราะห์ค่าทางสถิติของปริมาณแคลเซียมมาเลต ผลได้ และอัตราการผลิต
ด้วย *Acetobacter* sp. BX2 โดยใช้กากน้ำตาลที่อ้อยไม่ปรับสภาพและกากน้ำตาล
อ้อยที่ปรับสภาพด้วยวิธีต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอน

แหล่งคาร์บอน	ปริมาณแคลเซียมมาเลต (กรัมต่อลิตร)			ผลได้ (กรัมต่อกรัมน้ำตาล)			อัตราการผลิต (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)		
	N	Mean	Grouping	N	Mean	Grouping	N	Mean	Grouping
กากน้ำตาลอ้อยที่ไม่ปรับสภาพ	3	20.340	B	3	0.5160	A	3	0.12107	B
ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริก	3	18.138	B C	3	0.4936	A	3	0.10797	B C
ปรับสภาพด้วยถ่านกัมมันต์	3	16.050	C	3	0.4067	B	3	0.09553	C
ปรับสภาพด้วยแคลเซียมไฮดรอกไซด์	3	18.416	B C	3	0.4988	A	3	0.10962	B C
ปรับสภาพด้วยโพแทสเซียม-เพอโรซายาไนต์	3	15.543	C	3	0.4845	A B	3	0.09252	C
ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกและแคลเซียมไฮดรอกไซด์	3	24.201	A	3	0.5579	A	3	0.14405	A

ไม่วารณิใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ง.5 แสดงการวิเคราะห์ค่าทางสถิติของปริมาณแคลเซียมมาเลต ผลได้ และอัตราการผลิตด้วย *Acetobacter* sp. BX2 โดยใช้กากน้ำตาลที่อ้อยที่ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกและแคลเซียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันเป็นแหล่งคาร์บอน

ANOVA						
		DF	Sum of squares	Mean Squares	F-Value	P-Value
ปริมาณ แคลเซียมมา เลต	ความเข้มข้น น้ำตาลเริ่มต้น	3	1503.53	501.178	104.70	0.000
	Error	8	38.29	4.787		
	Total	11	1541.83			
ผลได้	ความเข้มข้น น้ำตาลเริ่มต้น	3	0.23228	0.077427	15.54	0.001
	Error	8	0.03987	0.004884		
	Total	11	0.27215			
อัตราการ ผลิต	ความเข้มข้น น้ำตาลเริ่มต้น	3	0.072508	0.024169	104.70	0.000
	Error	8	0.001847	0.000231		
	Total	11	0.074355			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ง.6 แสดงการวิเคราะห์ค่าทางสถิติของปริมาณแคลเซียมมาเลต ผลได้ และอัตราการผลิต ด้วย *Acetobacter* sp. BX2 โดยใช้กากน้ำตาลที่อ้อยที่ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกและ แคลเซียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันเป็นแหล่งคาร์บอน ด้วยวิธีของ Duncan ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

ความเข้มข้น น้ำตาลเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณแคลเซียมมาเลต (กรัมต่อลิตร)			ผลได้ (กรัมต่อกรัม น้ำตาล)			อัตราการผลิต (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)		
	N	Mean	Grouping	N	Mean	Grouping	N	Mean	Grouping
50	3	9.40	C	3	0.4898	B	3	0.06526	C
100	3	25.51	B	3	0.6956	A	3	0.1771	B
150	3	30.747	B	3	0.34973	B	3	0.21352	B
200	3	40.272	A	3	0.36172	B	3	0.27966	A

ตารางที่ ง.7 แสดงการวิเคราะห์ค่าทางสถิติของปริมาณแคลเซียมมาเลต ผลได้ และอัตราการผลิต ด้วย *Acetobacter* sp. BX2 โดยใช้กากน้ำตาลที่อ้อยที่ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกและ แคลเซียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้น 200 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และใช้ corn steep liquor ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันเป็นแหล่งไนโตรเจน

ANOVA						
		DF	Sum of squares	Mean Squares	F-Value	P-Value
ปริมาณ แคลเซียมมา เลต	ความเข้มข้น แหล่งไนโตรเจน	4	64.27	16.067	827	0.003
	Error	10	19.42	1.942		
	Total	14	83.69			
ผลได้	ความเข้มข้น แหล่งไนโตรเจน	4	0.007674	0.001919	9.38	0.002
	Error	10	0.002045	0.000205		
	Total	14	0.009720			
อัตราการ ผลิต	ความเข้มข้น แหล่งไนโตรเจน	4	0.000000	0.000000	9.38	0.002
	Error	10	0.000000	0.000000		
	Total	14	0.000000			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษายเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้วยการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ง.8 แสดงการวิเคราะห์ค่าทางสถิติของปริมาณแคลเซียมมาเลต ผลได้ และอัตราการผลิต ด้วย *Acetobacter* sp. BX2 โดยใช้กากน้ำตาลที่อ้อยที่ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกและแคลเซียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้น 200 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และใช้ corn steep liquor ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันเป็นแหล่งไนโตรเจน ด้วยวิธีของ Duncan ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

ความเข้มข้นแหล่งไนโตรเจน (ร้อยละโดยปริมาตร)	ปริมาณแคลเซียมมาเลต (กรัมต่อลิตร)			ผลได้ (กรัมต่อกรัมน้ำตาล)			อัตราการผลิต (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)		
	N	Mean	Grouping	N	Mean	Grouping	N	Mean	Grouping
0.00	3	35.216	A B	3	0.39606	A	3	0.002357	A
0.25	3	38.453	A	3	0.39205	A B	3	0.002334	A B
0.50	3	37.493	A	3	0.33626	C	3	0.002002	C
0.75	3	35.170	A B	3	0.3543	B C	3	0.002109	B C
1.00	3	32.517	B	3	0.37305	A B C	3	0.002221	A B C

ตารางที่ ง.9 แสดงการวิเคราะห์ค่าทางสถิติของปริมาณแคลเซียมมาเลต ผลได้ และอัตราการผลิต ด้วย *Acetobacter* sp. BX2 โดยใช้กากน้ำตาลที่อ้อยที่ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกและแคลเซียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้น 200 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และใช้ corn steep liquor ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.25 โดยปริมาตร เป็นแหล่งไนโตรเจน

ANOVA						
		DF	Sum of squares	Mean Squares	F-Value	P-Value
ปริมาณแคลเซียมมาเลต	วัน	5	3542.92	708.583	1470.48	0.000
	Error	12	5.78	0.482		
	Total	17	3548.70			
ผลได้	วัน	5	1.87896	0.375793	1237.59	0.000
	Error	12	0.00364	0.000304		
	Total	17	1.88261			
อัตราการผลิต	วัน	5	0.003074	0.000615	2039.52	0.000
	Error	12	0.000004	0.000000		
	Total	17	0.003078			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้ภายในเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตีพิมพ์หรือเผยแพร่ข้อมูลใดๆ จากเอกสารฉบับนี้โดยไม่ได้รับอนุญาต

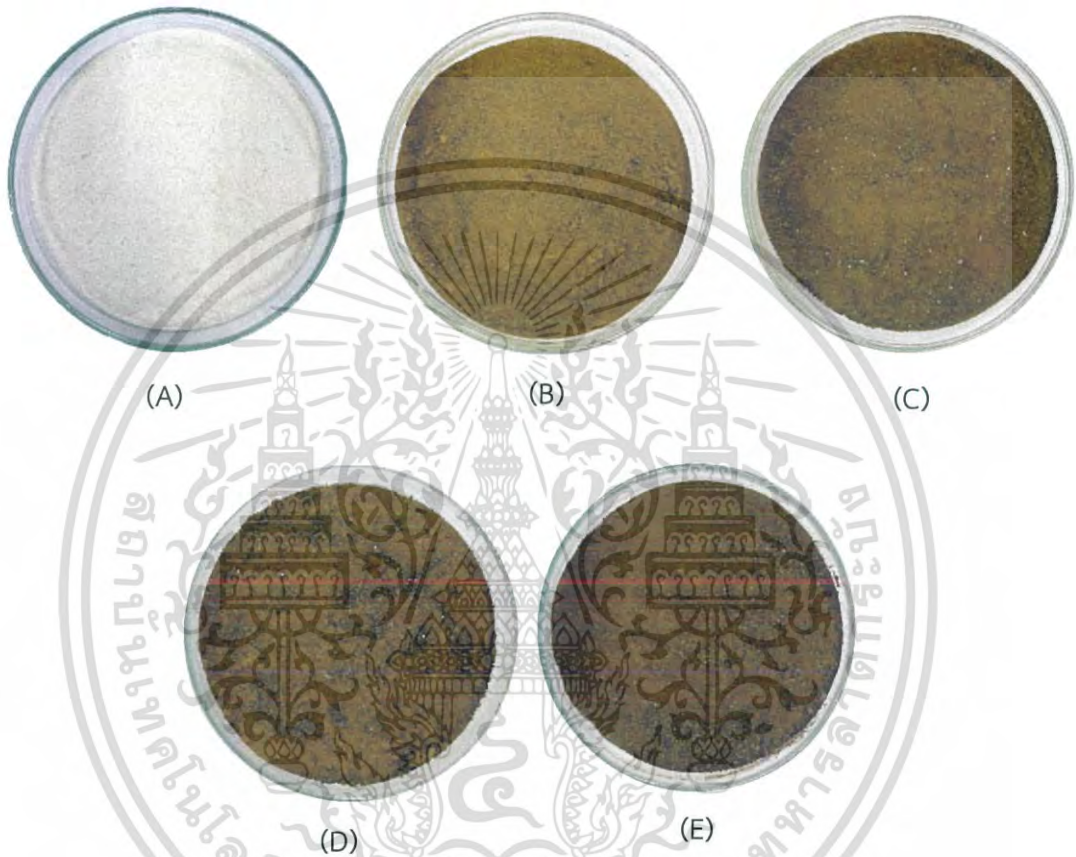
ตารางที่ ง.10 แสดงการวิเคราะห์ค่าทางสถิติของปริมาณแคลเซียมมาเลต ผลได้ และอัตราการผลิตด้วย *Acetobacter* sp. BX2 โดยใช้กากน้ำตาลที่อ้อยที่ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริก และแคลเซียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้น 200 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และใช้ corn steep liquor ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.25 โดยปริมาตร เป็นแหล่งไนโตรเจน ด้วยวิธีของ Duncan ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

วัน	ปริมาณแคลเซียมมาเลต (กรัมต่อลิตร)			ผลได้ (กรัมต่อกรัมน้ำตาล)			อัตราการผลิต (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)		
	N	Mean	Grouping	N	Mean	Grouping	N	Mean	Grouping
0	3	4.777	D	3	0.00000	D	3	0.00000	E
1	3	5.863	D	3	0.9137	A	3	0.038096	A
2	3	23.434	C	3	0.9281	A	3	0.019335	B
3	3	33.809	B	3	0.61470	B	3	0.008538	C
4	3	37.234	A	3	0.41915	C	3	0.004366	D
5	3	38.520	A	3	0.38393	C	3	0.003199	D

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก จ

รูปตัวอย่างตะกอนแคลเซียมมาเลต



รูปที่ จ.1 แสดงลักษณะตะกอนแคลเซียมมาเลตที่ได้จากการเพาะเลี้ยง *Acetobacter* sp. BX2 โดยการใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน (A) การใช้กากน้ำตาลอ้อยที่ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกและแคลเซียมไฮดรอกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอน (B) การใช้กากน้ำตาลอ้อยที่ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกและแคลเซียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้น 200 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน (C) การใช้ corn steep liquor ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.25 โดยปริมาตร เป็นแหล่งไนโตรเจน (D) และการใช้กากน้ำตาลอ้อยที่ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกและแคลเซียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 200 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และมี corn steep liquor ความเข้มข้นร้อยละ 0.25 โดยปริมาตร เป็นแหล่งไนโตรเจน (E) ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์และสงวนสิทธิ์ในเนื้อหา ไม่สามารถนำข้อมูลไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้