

การผลิตกรดมาลิกจากสารไฮโดรไลเซทเปลือกข้าวโพดโดยเชื้อ  
แบคทีเรียไอโซเลต FX1

PRODUCTION OF MALIC ACID FROM CORN HULL  
HYDROLYSATE BY THE BACTERIUM, ISOLATE FX1



โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร  
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)  
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้ **ปีการศึกษา 2560** ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

PRODUCTION OF MALIC ACID FROM CORN HULL  
HYDROLYSATE BY THE BACTERIUM, ISOLATE FX1



A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF  
THE REQUIREMENT FOR  
THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE (BIOTECHNOLOGY)  
DEPARTMENT OF BIOLOGY, FACULTY OF SCIENCE  
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้ภายในเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ACADEMIC YEAR 2017  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ การผลิตกรดมาลิกจากสารไฮโดรไลเซตเปลือกข้าวโพดโดยเชื้อแบคทีเรีย  
ไอโซเลต FX1

Production of malic acid from corn hull hydrolysate by the  
bacterium, isolate FX1

ชื่อนักศึกษา นางสาวณัฐชา เนียมหอม รหัสนักศึกษา 57050697  
นางสาวพัชราวดี โสบันทร รหัสนักศึกษา 57050735


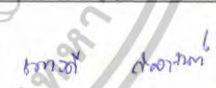
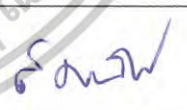
ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

ภาควิชา ชีววิทยา

ปีการศึกษา 2560

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร.สมพิศ สอนโยธา

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้  
โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต  
(เทคโนโลยีชีวภาพ) ประจำปีการศึกษา 2560

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ผศ.ดร.ดวงกมล เรือนงาม ประธานกรรมการ	
อ.ธนาวัต ก่ออานันต์ กรรมการ	
ผศ.ดร.สมพิศ สอนโยธา กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ	การผลิตกรดมาลิกจากสารไฮโดรไลเซทเปลือกข้าวโพดโดยเชื้อแบคทีเรีย FX 1		
ชื่อนักศึกษา	นางสาวธนัฐชา เนียมหอม	รหัสนักศึกษา 57050697	
	นางสาวพัชรวดี โสบันหริ	รหัสนักศึกษา 57050735	
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)		
ภาควิชา	ชีววิทยา		
คณะ	วิทยาศาสตร์		
มหาวิทยาลัย	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)		
ปีการศึกษา	2560		
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร.สมพิศ สอนโยธา		

### บทคัดย่อ

โครงการพิเศษนี้ได้ทำการศึกษการผลิตกรดมาลิกโดยการหมักแบคทีเรียไอโซเลต FX1 ในอาหารสูตร calcium malate production และใช้สารไฮโดรไลเซทจากเปลือกข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงไอโซเลต FX1 ในอาหารที่มีน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นในสารไฮโดรไลเซทจากเปลือกข้าวโพดเท่ากับ 120 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ให้ผลผลิตแคลเซียมมาเลตเท่ากับ  $8.333 \pm 0.37$  กรัมต่อลิตร และศึกษาผลของการใช้สารไฮโดรไลเซทจากเปลือกข้าวโพดร่วมกับน้ำตาลชนิดต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงไอโซเลต FX1 ในอาหารที่มีน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นในสารไฮโดรไลเซทจากเปลือกข้าวโพดเท่ากับ 25 กรัมต่อลิตร ร่วมกับน้ำตาลไซโลสเท่ากับ 75 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ให้ผลผลิตแคลเซียมมาเลตเท่ากับ  $20.458 \pm 1.12$  กรัมต่อลิตร นอกจากนี้ยังได้ศึกษาผลของปริมาณแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดมาลิก พบว่าแบคทีเรียไอโซเลต FX1 สามารถผลิตแคลเซียมมาเลตได้สูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มี corn steep liquor เป็นแหล่งไนโตรเจนปริมาณร้อยละ 0.4 โดยปริมาตร และมีน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นในสารไฮโดรไลเซทจากเปลือกข้าวโพดเท่ากับ 25 กรัมต่อลิตร ร่วมกับน้ำตาลไซโลสเท่ากับ 75 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน โดยสามารถผลิตแคลเซียมมาเลตได้สูงถึง  $38.820 \pm 1.63$  กรัมต่อลิตร และจากการศึกษาในครั้งนี้ทำให้ทราบว่าไอโซเลต FX1 สามารถผลิตกรดมาลิกได้โดยการใช้ สารไฮโดรไลเซทจากเปลือกข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน ส่งผลให้เกิดการเพิ่มมูลค่าต่อวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรและช่วยลดต้นทุนในการผลิต

**คำสำคัญ :** กรดมาลิก แคลเซียมมาเลต สารไฮโดรไลเซทจากเปลือกข้าวโพด แหล่งคาร์บอน

เอกสารนี้เป็นเอกสารไอโซเลต FX1 สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

<b>Title</b>	Production of malic acid from corn hull hydrolysate by the bacterium, isolate FX1		
<b>Students</b>	Miss Thanatcha Niamhom	Student ID 57050697	
	Miss Patcharawadee Sopanri	Student ID 57050735	
<b>Degree</b>	Bachelor of Science (Biotechnology)		
<b>Department</b>	Biology		
<b>Faculty</b>	Science		
<b>University</b>	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)		
<b>Academic Year</b>	2017		
<b>Advisor</b>	Asst.Prof.Dr.Somphit Sornyotha		

### Abstract

The malic acid fermentation by a bacterium, namely the isolate FX1 was investigated in this special project. Corn hull hydrolysate as a low-cost renewable feedstock was used as the sole carbon source for the production of malic acid by cultivated cells in calcium malate production medium. Under the initial hydrolysate reducing sugar concentration 120 g/L, the malic acid production in calcium malate form was  $8.333 \pm 0.37$  g/L. Moreover, the mixture of corn hull hydrolysate and various sugars were used for malic acid production. The results obtained that, a high calcium malate production from medium containing the initial hydrolysate reducing sugar concentration 25 g/L and xylose 75 g/L as the carbon source reached  $20.458 \pm 1.12$  g/L. In this study, the effect of the concentration of nitrogen source on malic acid production was also elucidated. The results found that, the highest calcium malate production was obtained at  $38.820 \pm 1.63$  g/L, when cultivation the isolate FX1 in medium containing the initial hydrolysate reducing sugar concentration 25 g/L and xylose 75 g/L as the carbon source and using corn steep liquor as nitrogen source at 0.4% (v/v). From this study, we acknowledged that the isolate FX1 could produce malic acid by using corn hull hydrolysate as a carbon source, thus offers an

economically competitive process by using a low-value byproduct from agriculture for industrial production of bio-based malic acid.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นับญาติเหนือไปซึ่งประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมีเหตุดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**Keywords :** Malic acid, Calcium malate, Corn hull hydrolysate, Carbon source,

Isolate FX1

## กิตติกรรมประกาศ

โครงการพิเศษฉบับนี้มีความสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี เนื่องจากการให้ความกรุณาจากอาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร.สมพิศ สอนโยธา ซึ่งคอยให้ความช่วยเหลือ ชี้แนะแนวทางในการแก้ไขปัญหาและข้อบกพร่องต่าง ๆ ตลอดระยะเวลาการทำโครงการพิเศษ เพื่อให้โครงการพิเศษฉบับนี้มีความถูกต้อง สมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร.ดวงกมล เรืองงาม และอาจารย์ธนาวัต ก่ออานันต์ ที่ช่วยให้ความรู้ และคำแนะนำต่าง ๆ รวมไปถึงคณะอาจารย์ในสาขาวิชาชีววิทยาทุกท่านที่มอบความรู้และทักษะในการปฏิบัติงานต่าง ๆ ที่จะนำมาใช้ในการทำโครงการพิเศษฉบับนี้ได้เป็นอย่างดี

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่และนักวิทยาศาสตร์ทุกท่านที่ให้ความอนุเคราะห์ในการเบิกอุปกรณ์และสารเคมี พร้อมทั้งช่วยให้คำแนะนำที่ถูกต้องในการปฏิบัติการต่าง ๆ และคอยอำนวยความสะดวกในการใช้ห้องปฏิบัติการ

ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดาของผู้จัดทำ ที่คอยให้ความช่วยเหลือ เป็นกำลังใจ และให้การสนับสนุนในด้านต่าง ๆ เสมอมา

ขอขอบคุณพี่ น้อง และเพื่อนๆ ทุกคนที่คอยให้กำลังใจ ให้ความช่วยเหลือ และข้อเสนอแนะต่าง ๆ ตลอดระยะเวลาการทำโครงการพิเศษ

ธนัฐชา เนียมหอม  
พัชราวดี โสบันหริ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ข
กิตติกรรมประกาศ.....	ค
สารบัญ.....	ง
สารบัญตาราง.....	ฉ
สารบัญรูป.....	ญ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 กรดมาลิก.....	4
2.1.1 มูลค่าของกรดมาลิก.....	5
2.2 กระบวนการผลิตกรดมาลิก.....	6
2.2.1 การผลิตกรดมาลิกโดยกระบวนการทางเคมี.....	6
2.2.2 การผลิตกรดมาลิกโดยกระบวนการทางชีวภาพ.....	7
2.2.2.1 วิถีเพนโตสฟอสเฟต (Pentose phosphate pathway : PPP).....	8
2.2.2.2 การผลิตกรดมาลิกจากวัฏจักรเครบส์ (Kreb's cycle or Tricarboxylic acid cycle)	
.....	12
2.2.2.3 การผลิตกรดมาลิกจากวิถีอื่นๆ.....	15
2.3 จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตกรดมาลิก.....	18

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.4 วัสดุิกโนเซลลูโลส .....	24
2.4.1 องค์ประกอบและโครงสร้างของวัสดุิกโนเซลลูโลส.....	25
2.5 ข้าวโพด.....	26
2.5.1 ชนิดของข้าวโพด .....	26
2.5.1.1 การจัดจำแนกชนิดของข้าวโพดตามกลุ่ม.....	26
2.5.1.2 การจำแนกทางพฤกษศาสตร์.....	27
2.5.1.3 การจำแนกตามวัตถุประสงค์ของการปลูก .....	28
2.5.2 สถานการณ์การผลิตข้าวโพดในประเทศไทย ปีเพาะปลูก 2550-2556 .....	28
2.6 กระบวนการปรับสภาพ.....	33
2.6.1 การปรับสภาพโดยวิธีทางกายภาพ (physical pretreatment) .....	34
2.6.2 การปรับสภาพโดยวิธีทางกายภาพร่วมกับเคมี (physicochemical pretreatment)....	34
2.6.2.1 การระเบิดด้วยไอน้ำ (steam explosion).....	34
2.6.2.2 การระเบิดด้วยแอมโมเนีย (ammonia fiber explosion, AFEX) .....	34
2.6.3 การปรับสภาพโดยวิธีทางเคมี.....	35
2.6.3.1 การปรับสภาพด้วยโอโซน (ozonolysis).....	35
2.6.3.2 การปรับสภาพด้วยกรด (acid hydrolysis) .....	35
2.6.3.3 การปรับสภาพด้วยด่าง (alkaline hydrolysis) .....	36
2.6.3.4 การกำจัดลิกนินโดยวิธีการออกซิเดชัน (oxidative delignification).....	36
2.6.4 การปรับสภาพโดยวิธีทางชีวภาพ.....	37
2.7 กระบวนการแยกกรดมาลิกให้บริสุทธิ์.....	40
2.8 ประโยชน์ของกรดมาลิก .....	41

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.8.1 อุตสาหกรรมเครื่องสำอางและการแพทย์ .....	41
2.8.2 อุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม .....	41
2.8.3 อุตสาหกรรมทางด้านโลหะ.....	41
2.8.4 การนำไปใช้เป็นสารคีเลต (chelation agent).....	42
<b>บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย.....</b>	<b>43</b>
3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์.....	43
3.2 สารเคมี .....	44
3.3 ขั้นตอนการดำเนินงาน .....	46
3.3.1 แบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษา .....	46
3.3.2 การเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรียเริ่มต้น.....	46
3.3.3 การปรับสภาพเปลือกข้าวโพดด้วยด่างโซเดียมไฮดรอกไซด์ .....	46
3.3.4 การศึกษาผลของการใช้เอนไซม์เซลลูเลสทางการค้าย่อยสลายเปลือกข้าวโพดที่ผ่านการ ปรับสภาพแล้ว.....	46
3.3.5 การศึกษาการใช้สารไฮโดรไลเซตเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตกรดมาลิกใน ฟลาสก์โดย แบคทีเรียไอโซเลต FX1 .....	47
3.3.5.1 การศึกษาการผลิตกรดมาลิกโดยใช้สารไฮโดรไลเซตเป็นแหล่งคาร์บอน .....	47
3.3.5.2 การศึกษาการผลิตกรดมาลิกโดยใช้สารไฮโดรไลเซตร่วมกับน้ำตาลกลูโคสหรือ โซโลสเป็นแหล่งคาร์บอน .....	47
3.3.5.3 การศึกษาผลของปริมาณแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดมาลิกโดย แบคทีเรียไอโซเลต FX1 .....	48
3.3.6 การเก็บตัวอย่างเพื่อนำไปวิเคราะห์ .....	48
3.3.7 การวิเคราะห์ปริมาณแคลเซียมมาเลต .....	49

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.3.7.1 การตกตะกอนแคลเซียมมาเลตด้วยเมทานอล.....	49
3.3.7.2 การหาปริมาณแคลเซียมมาเลตด้วยวิธีการไทเทรต.....	49
3.3.8 การตรวจสอบหาปริมาณน้ำตาล.....	49
3.3.8.1 การตรวจสอบหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS.....	49
3.3.9 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ CMCase.....	50
3.3.10 การหาปริมาณโปรตีนสารละลายเอนไซม์.....	50
<b>บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล.....</b>	<b>51</b>
4.1 การศึกษาผลของการใช้เอนไซม์เซลลูเลสทางการค้าย่อยสลายเปลือกข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพด้วยด่างโซเดียมไฮดรอกไซด์.....	51
4.1.1 ผลของการปรับสภาพเปลือกข้าวโพดด้วยด่างโซเดียมไฮดรอกไซด์.....	51
4.1.2 การศึกษาผลของการใช้เอนไซม์เซลลูเลสทางการค้าย่อยสลายเปลือกข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพแล้ว.....	52
4.2 ผลของการศึกษาการใช้สารไฮโดรไลเซตเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตกรดมาลิกในพลาสก์โดยแบคทีเรียไอโซเลต FX1.....	55
4.2.1 ผลของการศึกษาการผลิตกรดมาลิกโดยใช้สารไฮโดรไลเซตเป็นแหล่งคาร์บอน.....	55
4.2.2 ผลของการศึกษาการผลิตกรดมาลิกโดยใช้สารไฮโดรไลเซตร่วมกับน้ำตาลกลูโคสหรือไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอน.....	57
4.3 การศึกษาผลของปริมาณแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดมาลิกโดยแบคทีเรียไอโซเลต FX1.....	62
<b>บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....</b>	<b>68</b>
5.1 สรุปผลการวิจัย.....	68
5.2 ข้อเสนอแนะ.....	69

เอกสารอ้างอิงที่สงวนไว้สำหรับกรอ้างอิงงานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านอื่น ๆ ได้  
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
ภาคผนวก.....	80
ภาคผนวก ก สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ.....	81
ภาคผนวก ข การเตรียมสารเคมี.....	82
ภาคผนวก ค การคำนวณที่เกี่ยวข้อง.....	88



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 2.1 มูลค่าของกรดมาลิกเมื่อเปรียบเทียบกับกรดอินทรีย์อื่นๆ.....	5
ตารางที่ 2.2 การผลิตกรดมาลิกโดยกระบวนการหมักจากเชื้อรา.....	19
ตารางที่ 2.3 ปริมาณกรดมาลิกที่ถูกผลิตขึ้นโดยเซลล์แบคทีเรียชนิดต่างๆที่ถูกตรึงในพอลิอะครีลาไมด์เจล.....	20
ตารางที่ 2.4 การผลิตกรดมาลิกโดยกระบวนการหมักจากยีสต์.....	22
ตารางที่ 2.5 การผลิตกรดมาลิกจากยีสต์ที่ใช้เทคโนโลยีพันธุวิศวกรรมในการปรับปรุงสายพันธุ์.....	23
ตารางที่ 2.6 ปริมาณของเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินในวัสดุลิกโนเซลลูโลสต่างๆ.....	24
ตารางที่ 2.7 แสดงสถิติการปลูกข้าวโพดเลี้ยงสัตว์(ทั่วประเทศ): เนื้อที่เพาะปลูก เนื้อที่เก็บเกี่ยว ผลผลิต และผลผลิตต่อไร่ พ.ศ. 2550 – 2559.....	31
ตารางที่ 2.8 แสดงสถิติการปลูกข้าวโพดหวาน : เนื้อที่เพาะปลูก เนื้อที่เก็บเกี่ยว ผลผลิต และผลผลิตต่อเนื้อที่ปลูก ปี 2558 – 2560.....	31
ตารางที่ 2.9 ข้อดีและข้อเสียของการปรับสภาพวัสดุลิกโนเซลลูโลสโดยวิธีการต่าง ๆ.....	38
ตารางที่ 4.1 แสดงปริมาณแคลเซียมมาเลต ผลได้ และอัตราการผลิต ตามลำดับ.....	56
ตารางที่ 4.2 แสดงปริมาณแคลเซียมมาเลต ผลได้ และอัตราการผลิต ตามลำดับ.....	58
ตารางที่ 4.3 แสดงปริมาณแคลเซียมมาเลต ผลได้ และอัตราการผลิต เมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียไอโซเลต FX1 ในอาหารที่มีสารไฮโดรไลเซทร่วมกับน้ำตาลไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอน และมีปริมาณไนโตรเจนที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 6 วัน.....	63
ตารางที่ ข1 การเตรียมสารละลายมาตรฐานกลูโคส ที่ความเข้มข้น 200, 400, 600, 800 และ 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร.....	82
ตารางที่ ข2 การเตรียมสารละลายมาตรฐานของโปรตีน ที่ความเข้มข้น 0, 50, 100, 150, 200 และ 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร.....	84
ตารางที่ ค1 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานกลูโคสที่ความเข้มข้นต่างๆ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร.....	88
ตารางที่ ค2 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ของชุดตัวอย่างเอนไซม์.....	89

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญตาราง (ต่อ)

หน้า

ตารางที่ ค3 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ของชุดควบคุม.....	90
ตารางที่ ค4 ค่าการดูดกลืนคลีนแสงของสารละลายมาตรฐานโปรตีนที่ความเข้มข้นต่างๆ (ไม่โครกรัมต่อมิลลิลิตร) ที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร .....	91
ตารางที่ ค5 ค่าการดูดกลืนแสงจากการวัดปริมาณโปรตีนในสารละลายเอนไซม์ Accellerase ที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร.....	92



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 2.1 แสดงโครงสร้างแบบ D และ L form ของกรดมาลิก .....	4
รูปที่ 2.2 การผลิตกรดมาลิกด้วยปฏิกิริยาไฮเดรชัน (Hydration) ของกรดมาลิก ภายใต้อุณหภูมิและความดันสูง .....	6
รูปที่ 2.3 การผลิตกรดมาลิกด้วยปฏิกิริยาไฮเดรชันของกรดฟูมาริกที่อุณหภูมิ 286 องศาเซลเซียส...	6
รูปที่ 2.4 กระบวนการเปลี่ยนน้ำตาลไซโลสเป็นไซลูโลส-5-ฟอสเฟต .....	8
รูปที่ 2.5 วิถีเพนโทสฟอสเฟต (Pentose phosphate pathway) .....	9
รูปที่ 2.6 การหมักน้ำตาลไซโลสด้วยวิถีเพนโทสฟอสเฟตและเข้าสู่วิถีไกลโคไลซิส .....	11
รูปที่ 2.7 วัฏจักรเครบส์ (Krebs cycle or Tricarboxylic acid cycle) .....	14
รูปที่ 2.8 การผลิตมาเลตตามวัฏจักรกรดซิตริกแบบผันกลับ แล้วส่งออกสู่ภายนอกเซลล์ .....	15
รูปที่ 2.9 การผลิตกรดมาลิกโดยวัฏจักรไกลออกซีเลต .....	16
รูปที่ 2.10 เกิดจากปฏิกิริยาคาร์บอกซิเลชันของไพรูเวตได้เป็นมาเลต.....	17
รูปที่ 2.11 วัฏจักร rTCA (Reverse Tricarboxylic acid) .....	21
รูปที่ 2.12 โครงสร้างของเซลล์ลูโลส .....	25
รูปที่ 2.13 ลักษณะของข้าวโพด.....	26
รูปที่ 2.14 การปรับสภาพวัตถุดิบที่แยกส่วนประกอบระหว่างของแข็งและของเหลว .....	33
รูปที่ 4.1 แผนภูมิแสดงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในสารละลายส่วนไซที่ได้จากการปรับสภาพด้วยต่างและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในสารไฮโดรไลเซตที่ได้จากการย่อยสลายเปลือกข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพด้วยต่าง.....	54
รูปที่ 4.2 แสดงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ และค่าพีเอชในน้ำเลี้ยงของไอโซเลต FX1 ณ วันต่างๆ โดยเฉพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร calcium malate production (Khan และคณะ, 2014).....	57
รูปที่ 4.3 แสดงค่าพีเอช (A) และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ (B) ของน้ำเลี้ยงไอโซเลต FX1 ณ วันที่ 0 และ วันที่ 6 โดยเฉพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร Calcium malate production .....	59
รูปที่ 4.4 แสดงปริมาณแคลเซียมมาเลตและผลได้ เมื่อเพาะเลี้ยงไอโซเลต FX1 ในสารไฮโดรไลเซตร่วมกับน้ำตาลแต่ละชนิด เป็นระยะเวลา 6 วัน โดย <input type="checkbox"/> คือ ปริมาณแคลเซียมมาเลตที่ผลิตได้ และ <input checked="" type="checkbox"/> คือ ผลได้.....	61

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญรูป (ต่อ)

หน้า

รูปที่ 4.5 แสดงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ (A) และค่าพีเอช (B) ของน้ำเลี้ยงไอโซเลต FX1 ณ เวลาต่างๆ โดยเฉพาะเลี้ยงในสารไฮโดรไลเซทร่วมกับน้ำตาลไซโลส ที่มีปริมาณแหล่งไนโตรเจนร้อยละ 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 และ 0.6 โดยปริมาตร ตามลำดับ.....	64
รูปที่ 4.6 แสดงปริมาณแคลเซียมมาเลตที่ผลิตได้และผลได้ เมื่อเพาะเลี้ยงไอโซเลต FX1 ในสารไฮโดรไลเซทร่วมกับน้ำตาลไซโลส ที่มีปริมาณแหล่งไนโตรเจนต่างๆ เป็นระยะเวลา 6 วัน โดย	
คือ ปริมาณแคลเซียมมาเลตที่ผลิตได้ และ <input checked="" type="checkbox"/> คือ ผลได้.....	66
รูปที่ ค1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกลูโคสและค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร.....	88
รูปที่ ค2 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานโปรตีนและค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร.....	91

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

กรดมาลิก (malic acid) เป็นกรดไดคาร์บอกซิลิกที่มีสูตรเคมีคือ  $C_4H_6O_5$  มีลักษณะเป็นผลึกสีขาวขนาดเล็ก สามารถละลายได้ในน้ำ และมีรสชาติที่เป็นเอกลักษณ์ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับรสเปรี้ยวในผลไม้ชนิดต่างๆ สามารถพบได้ในผลไม้ เช่น แอปเปิ้ล และพีชบางชนิด (Peleg และคณะ, 1988) โดยกรดมาลิกมีสองแบบ คือ แบบ L และแบบ D แต่มีเพียงแบบ L ที่สามารถพบได้ในธรรมชาติ นอกจากนี้กรดมาลิกยังถูกจัดเป็น 1 ใน 12 สารเคมีที่สามารถใช้เป็นสาร Building-Block ในการสังเคราะห์สารอื่นที่มีมูลค่าสูง (Werpy และคณะ, 2004) ซึ่งกรดมาลิกสามารถนำไปใช้งานได้หลากหลาย เช่น ใช้เป็นสารตัวกลางในการผลิตวัสดุชีวภาพ ใช้ในการสังเคราะห์สาร Maleic anhydride และ Tetrahydrofuran (Sauer และคณะ, 2008) และใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตพลาสติกย่อยสลายได้ (Goldberg และคณะ, 2006) รวมทั้งกรดมาลิกยังมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่อุณหภูมิสูงได้ดีกว่ากรดอะซิติกและกรดแลคติกอีกด้วย (Doyle, 1999) และในทางอุตสาหกรรมยังใช้กรดมาลิกเป็นสารเติมแต่งในอาหาร ยา และ เครื่องสำอางอีกด้วย ในปัจจุบันพบว่ามีความต้องการใช้กรดมาลิกในระดับอุตสาหกรรมเพิ่มมากขึ้น โดยส่วนใหญ่ถูกนำไปใช้ในอุตสาหกรรมสารปรุงแต่งอาหาร อุตสาหกรรมเครื่องดื่ม อุตสาหกรรมยา ซึ่งในอุตสาหกรรมอาหารนั้นมีการนำกรดมาลิกมาใช้แทนกรดซิตริก เนื่องจากให้รสชาติที่เปรี้ยวกลมกล่อมดีกว่ากรดซิตริก (Battat และคณะ, 1991)

กรดมาลิกสามารถผลิตได้ 2 วิธีคือวิธีทางเคมีและวิธีทางชีวภาพ ซึ่งวิธีทางเคมีผลิตได้โดยอาศัยปฏิกิริยาไฮเดรชันของกรดมาเลอิกหรือฟูมาลิกรวมกับน้ำ 2 โมเลกุล ภายใต้อุณหภูมิและความดันสูง ผลผลิตที่ได้เป็นสารผสมทั้งแบบ L และ D (Goldberg และคณะ, 2006) แม้จะได้ผลิตภัณฑ์เป็นจำนวนมาก และใช้เวลาสั้น แต่ผลิตภัณฑ์ที่ได้ละลายน้ำได้น้อยรวมทั้งอาจทำให้เกิดของเสียที่ทำลายสิ่งแวดล้อมและกระบวนการผลิตมีต้นทุนสูง นอกจากนี้ในระหว่างกระบวนการการผลิตมีการปล่อยมลภาวะออกสู่สิ่งแวดล้อมจากการใช้พลังงานความร้อนเพื่อเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาซึ่งส่งผลให้เกิดภาวะโลกร้อน (Nordell, 2003) และก่อให้เกิดการสะสมของสารพิษที่เป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิต หากได้รับในปริมาณมากก็จะทำให้เกิดผลกระทบต่อสุขภาพอีกด้วย ดังนั้นงานวิจัยส่วนมากจึงสนใจที่จะศึกษาการผลิตกรดมาลิกโดยวิธีทางชีวภาพ ซึ่งทำได้โดยการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อเปลี่ยนน้ำตาล แยกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ให้เป็นกรดอินทรีย์ โดยน้ำตาลสามารถผลิตได้จากวัสดุกลีโคไลซิสซึ่งเป็นวัสดุเหลือทิ้งทางการไม่วางกรรมใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมีเหตุดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เกษตร มีจำนวนมาก หาง่าย มีราคาถูก เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม และการผลิตโดยวิธีทางชีวภาพยังสามารถทำปฏิกิริยาได้ที่อุณหภูมิห้อง (Jeong และคณะ, 2011) นอกจากนี้การนี้การผลิตกรดมาลิกเริ่มต้นนั้นมักศึกษาจากเชื้อรา โดย *Aspergillus flavus* เป็นเชื้อราชนิดแรกที่พบว่าสามารถผลิตกรดมาลิกได้ แต่เนื่องจากเชื้อรามีการสร้างเส้นใยซึ่งส่งผลต่อการหมัก (Abe และคณะ, 1962) จึงได้มีการพยายามศึกษาคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดมาลิกได้แทนเชื้อรา ซึ่งแบคทีเรียที่มีการเจริญเติบโตที่รวดเร็วและไม่มีการสร้างเส้นใย (David, 2012) นอกจากนี้ในปัจจุบันยังมีงานวิจัยที่สนใจใช้สารไฮโดรไลเซทจากวัสดุลิกโนเซลลูโลสมาเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตมาลิก ดังเช่น รายงานของ Xiang และคณะ (2015) ใช้สารไฮโดรไลเซทจากชังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอนมาผลิตกรดมาลิก โดยเชื้อรา *Aureobasidium pullulans* YJ 6-11 พบว่าเมื่อใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ในสารไฮโดรไลเซทเริ่มต้น 90 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตกรดมาลิกได้ 32.4 กรัมต่อลิตร และมีอัตราการผลิตกรดมาลิกเท่ากับ 0.52 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง รวมทั้งยังมีรายงานของ Chi และคณะ (2017) ทดลองใช้สารไฮโดรไลเซทจากเปลือกเมล็ดถั่วเหลืองเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตกรดมาลิก โดยเชื้อรา *A. pullulans* ZX-10 พบว่าเมื่อใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ในสารไฮโดรไลเซทเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตกรดมาลิกได้ 38.8 กรัมต่อลิตร และมีอัตราการผลิตกรดมาลิกเท่ากับ 0.23 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และจากการศึกษาก่อนหน้านี้ ได้มีการคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดมาลิกได้โดยใช้น้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าแบคทีเรียไอโซเลต FX1 ที่สามารถคัดแยกได้จากบ่อบำบัดน้ำเสีย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (ประภัสสร เทพกัญช์ และสุพรรณิกา ยอดสง่า, 2557) สามารถใช้ทั้งน้ำตาลกลูโคสและไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอน ประกอบกับประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรมจึงทำให้มีวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรเป็นจำนวนมาก ดังนั้นโครงการพิเศษนี้จึงได้มีการพยายามที่จะศึกษาการผลิตกรดมาลิกโดยเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต FX1 ด้วยการนำสารไฮโดรไลเซทจากเปลือกข้าวโพดซึ่งเป็นวัสดุลิกโนเซลลูโลสมาเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อสามารถนำความรู้ที่ได้ไปใช้เป็นแนวทางในการผลิตกรดมาลิกจากวัสดุลิกที่มีราคาถูกต่อไป

## 1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

- 1) เพื่อศึกษาการปรับสภาพเปลือกข้าวโพดด้วยต่างโซเดียมไฮดรอกไซด์
- 2) เพื่อศึกษาผลของการใช้เอนไซม์เซลลูเลสทางการค้าย่อยสลายเปลือกข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพด้วยต่างโซเดียมไฮดรอกไซด์
- 3) เพื่อศึกษาการผลิตกรดมาลิกโดยใช้สารไฮโดรไลเซทเป็นแหล่งคาร์บอนโดยแบคทีเรีย

ไอโซเลต FX1 ที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4) เพื่อศึกษาผลของปริมาณแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดมาลิกโดยแบคทีเรีย ไอโซเลต FX1

### 1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1) ทำการปรับสภาพเปลือกข้าวโพดด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้น 0.05 0.1 0.25 1 2 และ 2.5 โมลาร์ ตามลำดับ โดยใช้เปลือกข้าวโพดต่อโซเดียมไฮดรอกไซด์ในอัตราส่วน 1:20

2) ทำการย่อยสลายเปลือกข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพด้วยเอนไซม์เซลลูเลสทางการค้า โดยใช้เอนไซม์ 48.05 ยูนิตต่อเปลือกข้าวโพด 0.5 กรัม

3) ทำการศึกษาผลของการใช้สารไฮโดรไลเซทร่วมกับน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตกรดมาลิกโดยไอโซเลต FX1

4) ทำการศึกษาการจำกัดปริมาณแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดมาลิกโดยแบคทีเรียไอโซเลต FX1

5) ทำการวัดค่าความเป็นกรดต่างด้วยเครื่องวัดความเป็นกรดต่าง (pH Meter)

6) ทำการศึกษาปริมาณแคลเซียมมาเลตด้วยวิธีการไทเทรต

7) ทำการศึกษาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS

### 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1) สามารถผลิตกรดมาลิกโดยกระบวนการทางชีวภาพได้

2) สามารถลดต้นทุนในการผลิตกรดมาลิกโดยการใช้วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรเป็นแหล่งคาร์บอน

3) สามารถเพิ่มรายได้ให้แก่เกษตรกรโดยการเพิ่มมูลค่าให้กับวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 2

# ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

### 2.1 กรดมาลิก

กรดมาลิก (Malic acid) เป็นกรดอินทรีย์ในกลุ่มกรดไดคาร์บอกซิลิกที่ประกอบด้วยคาร์บอน 4 อะตอม (Goldberg และคณะ, 2006) มีสูตรทางเคมีคือ  $C_4H_6O_5$  มีชื่อทางเคมีว่า Hydroxybutaneic acid หรือ Hydroxysuccinic acid (Theron และคณะ, 2010) กรดมาลิกมีโครงสร้างอยู่ 2 แบบ คือ แบบดีและแอล ดังรูปที่ 2.1 โดยแบบดีจะถูกสังเคราะห์ขึ้น แต่แบบแอลจะสามารถสังเคราะห์ขึ้นและสามารถพบได้ทั่วไปตามธรรมชาติ อย่างเช่นในผลไม้ที่มีรสเปรี้ยว ได้แก่ แอปเปิ้ล องุ่น และฝรั่ง เป็นต้น (Peleg และคณะ, 1988) กรดมาลิกมีอัตราการผลิตปีละประมาณ 40,000 ตัน (Goldberg และคณะ, 2006) และคาดว่ากรดมาลิกจะเป็นสารเคมีที่ได้รับความสนใจและต้องการใช้กันอย่างแพร่หลายในวงการอุตสาหกรรมต่างๆ มากกว่า 200,000 ตันต่อปี (Alonso และคณะ, 2015) โดยกรดมาลิกส่วนใหญ่จะถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร เครื่องดื่ม ยารักษาโรค เครื่องสำอาง ผลิตภัณฑ์ทำความสะอาดโลหะ และพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (Goldberg และคณะ, 2006 ; Hronska และคณะ, 2015) รวมทั้งกรดมาลิกยังมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่อุณหภูมิสูงได้ดีกว่ากรดอะซิติกและกรดแลคติกอีกด้วย (Doyle, 1999)



รูปที่ 2.1 แสดงโครงสร้างแบบ D และ L from ของกรดมาลิก

ที่มา : Shi และ Lu (2013)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 2.1.1 มูลค่าของกรดมาลิก

นอกจากประโยชน์ของกรดมาลิกที่สามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมได้อย่างหลากหลาย ไม่ว่าจะเป็นอุตสาหกรรมอาหาร เครื่องสำอาง ยา และอุตสาหกรรมพอลิเมอร์ เมื่อนำมูลค่าของกรดมาลิกมาเปรียบเทียบกับกรดอินทรีย์ชนิดอื่น ๆ พบว่ากรดมาลิกยังคงมีมูลค่าสูงกว่ากรดอินทรีย์หลายชนิดอีกด้วย ดังตารางที่ 2.1 โดยในปัจจุบันกรดมาลิกยังเป็นกรดอินทรีย์ที่กระทรวงพลังงานของประเทศสหรัฐอเมริกาให้ความสนใจและให้ความสำคัญในการผลิต เนื่องจากถูกจัดเป็นสาร Building Block ที่ใช้เป็นสารตั้งต้นในอุตสาหกรรมต่างๆได้อย่างหลากหลาย (Werpy และคณะ, 2004) และคาดว่าในอนาคตกรดมาลิกจะเป็นสารเคมีที่ได้รับความสนใจและต้องการใช้กันอย่างแพร่หลายในวงการอุตสาหกรรมต่างๆ

ตารางที่ 2.1 มูลค่าของกรดมาลิกเมื่อเปรียบเทียบกับกรดอินทรีย์อื่น ๆ

กรดอินทรีย์	ปริมาณ (กรัม)	ราคา (บาท)
Malic acid	100	2,516.85
Succinic acid	100	1,486.14
Fumaric acid	100	1,574.82
Itaconic acid	100	1,181.72
Propionic acid	100	1,972.73
Acetic acid	100	2,924.34

หมายเหตุ : ใช้อัตราแลกเปลี่ยนจากดอลลาร์สิงคโปร์เป็นบาทโดยใช้อัตราแลกเปลี่ยนที่ 1 ดอลลาร์สิงคโปร์ เท่ากับ 24.1794 บาท (อัตราแลกเปลี่ยนวันที่ 28 มิถุนายน พ.ศ. 2561)

ที่มา : ดัดแปลงจาก Sauer และคณะ (2008)

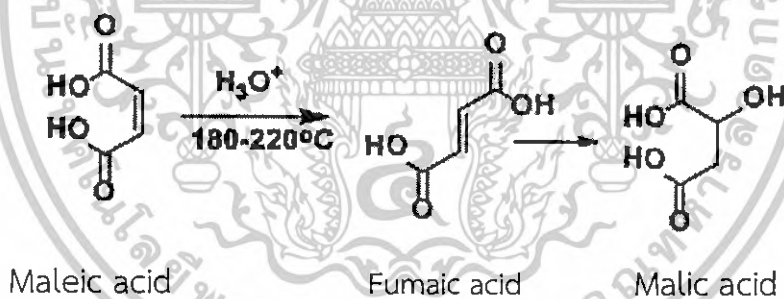
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.2 กระบวนการผลิตกรดมาลิก

การผลิตกรดมาลิกโดยวิธีการดั้งเดิม คือการสกัดจากน้ำแอปเปิล ได้ปริมาณกรดมาลิกประมาณร้อยละ 0.4 – 0.7 จึงไม่ค่อยเป็นที่นิยมมากนัก เนื่องจากได้ผลผลิตของกรดมาลิกในปริมาณน้อย และมีคุณภาพค่อนข้างต่ำ ดังนั้นจึงมีการพัฒนากระบวนการผลิตกรดมาลิกให้มีประสิทธิภาพมากขึ้นจากกระบวนการทางเคมีและชีวภาพ

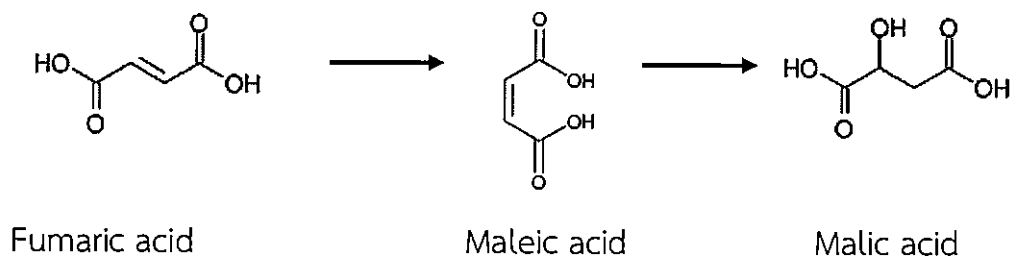
### 2.2.1 การผลิตกรดมาลิกโดยกระบวนการทางเคมี

การผลิตกรดมาลิกจากกระบวนการทางเคมีสามารถผลิตได้โดยอาศัยปฏิกิริยาไฮเดรชันของกรดมาลิกหรือฟูมาลิกรวมกับน้ำ 2 โมเลกุล ภายใต้อุณหภูมิและความดันสูง ดังรูปที่ 2.2 และรูปที่ 2.3 ตามลำดับ ผลผลิตที่ได้จะเป็นสารผสมทั้งแบบดีและแอล (Goldberg และคณะ, 2006) แม้จะได้ผลิตภัณฑ์เป็นจำนวนมาก และใช้ระยะเวลาอันสั้น แต่ผลิตภัณฑ์ที่ได้นั้นละลายน้ำได้น้อยรวมทั้งอาจทำให้เกิดของเสียที่ทำลายสิ่งแวดล้อม โดยในระหว่างกระบวนการการผลิตจะมีการปล่อยมลภาวะออกสู่สิ่งแวดล้อมจากการใช้พลังงานความร้อนเพื่อเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาซึ่งส่งผลให้เกิดภาวะโลกร้อน (Nordell, 2003) และก่อให้เกิดการสะสมของสารพิษที่เป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิต หากได้รับในปริมาณมากก็จะทำให้เกิดผลกระทบต่อสุขภาพ



รูปที่ 2.2 การผลิตกรดมาลิกด้วยปฏิกิริยาไฮเดรชัน (Hydration) ของกรดมาลิก ภายใต้อุณหภูมิและความดันสูง

ที่มา : Musa (2016)



รูปที่ 2.3 การผลิตกรดมาลิกด้วยปฏิกิริยาไฮเดรชันของกรดฟูมาริกที่อุณหภูมิ 286 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี เมื่อผู้ใดนำเอกสารนี้ไปเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ทำซ้ำ, ตัดทอน, หรือเผยแพร่ซ้ำโดยไม่ได้รับอนุญาต  
ที่มา : March และ Brow (2017) ภาของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 2.2.2 การผลิตกรดมาลิกโดยกระบวนการทางชีวภาพ

การผลิตกรดมาลิกโดยกระบวนการทางชีวภาพอาศัยความสามารถในการสังเคราะห์กรดมาลิกผ่านวิถีเพนโทสฟอสเฟต (Pentose phosphate pathway) วัฏจักรกรดไตรคาร์บอกซิลิก (Krebs cycle or Tricarboxylic acid cycle) และวิถีอื่น ๆ การผลิตกรดมาลิกโดยกระบวนการทางชีวภาพของจุลินทรีย์โดยส่วนใหญ่จะใช้น้ำตาลที่มีราคาถูก และมีจำนวนมากโดยได้จากการย่อยสลายวัสดุลิกโนเซลลูโลสหรือชีวมวล ซึ่งชีวมวลที่สามารถนำมาใช้แบ่งได้เป็น 3 ประเภท ได้แก่ (Glazer และ Nikaido, 2007)

1. วัตถุดิบที่มีน้ำตาลสูง เช่น อ้อย กากน้ำตาล และผลไม้ต่างๆ เป็นต้น ซึ่งสามารถนำเข้าสู่กระบวนการหมักได้โดยตรง
2. วัตถุดิบประเภทแป้ง เช่น ข้าวโพด ข้าวฟ่าง ข้าวสาลี และมันสำปะหลัง เป็นต้น โดยก่อนที่จะเข้าสู่กระบวนการหมัก ต้องเปลี่ยนวัตถุดิบประเภทนี้ให้เป็นน้ำตาลก่อนโดยใช้เอนไซม์และเข้าสู่การหมักต่อไป
3. วัสดุลิกโนเซลลูโลส เช่น ฟางข้าว ชานอ้อย และไม้เนื้ออ่อน เป็นต้น ก่อนนำวัสดุลิกโนเซลลูโลสไปใช้จะต้องผ่านการปรับสภาพ และถูกเปลี่ยนเป็นน้ำตาลก่อนโดยใช้เอนไซม์ และนำไปหมักเพื่อผลิตกรดมาลิกต่อไป

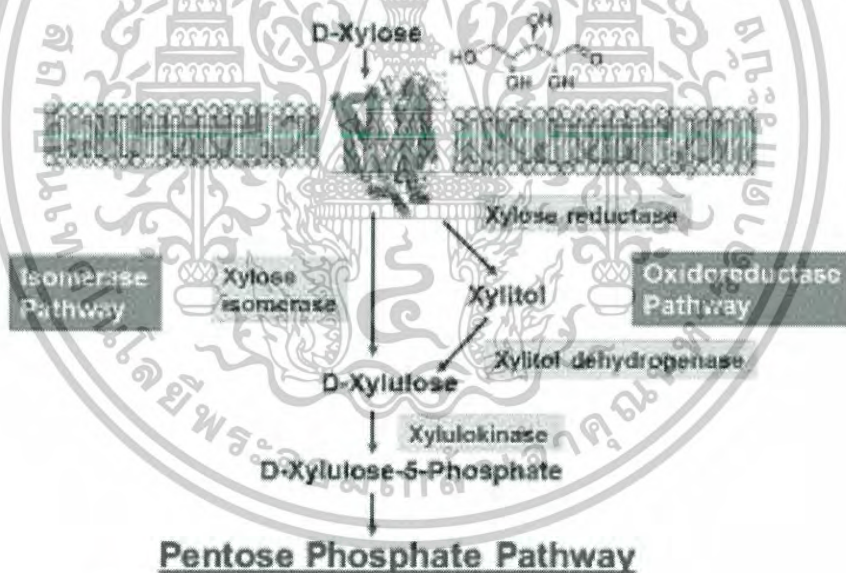
ถึงแม้ว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการผลิตทางชีวภาพมีปริมาณค่อนข้างต่ำแต่จะผลิตกรดมาลิกในรูปของ L-form เท่านั้นซึ่งกระบวนการผลิตทางเคมีไม่สามารถทำได้ ดังนั้นเมื่อเปรียบเทียบในเชิงพาณิชย์แล้ว การผลิตกรดมาลิกด้วยกระบวนการผลิตทางชีวภาพจึงได้เปรียบมากกว่าการผลิตทางเคมี ทั้งในด้านราคาต้นทุนการผลิตที่ถูกกว่า และลดขั้นตอนการทำผลิตภัณฑ์ให้บริสุทธิ์ (Goldberg และคณะ, 2006)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 2.2.2.1 วิถีเพนโทสฟอสเฟต (Pentose phosphate pathway : PPP)

น้ำตาลไซโลสเป็นน้ำตาลที่มีคาร์บอน 5 อะตอม ซึ่งจุลินทรีย์ไม่สามารถเปลี่ยนเป็นพลังงานได้โดยตรง จึงจำเป็นต้องเปลี่ยนน้ำตาลไซโลสให้เป็นไซลูโลส-5-ฟอสเฟต (xylose-5-phosphate, X5P) ดังรูปที่ 2.4 หลังจากนั้น X5P จึงเข้าสู่วิถีเพนโทสฟอสเฟต (รูปที่ 2.5) (pentose phosphate pathway, PPP) และเข้าสู่กระบวนการไกลโคไลซิสเพื่อให้ได้พลังงานใช้ในการเจริญ และสร้างสารต่างๆ

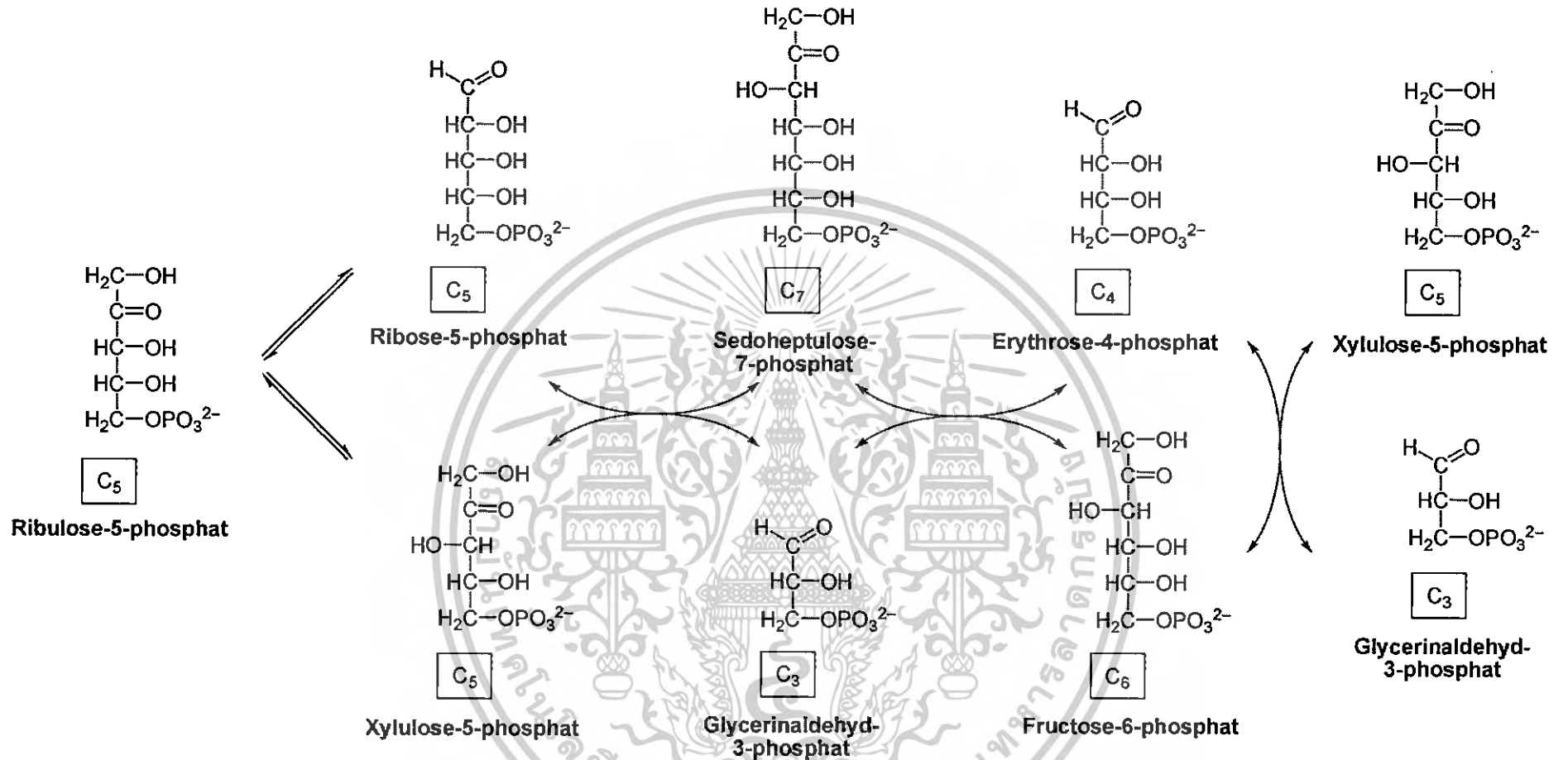
ในยีสต์ที่หมักน้ำตาลไซโลสได้ ส่วนใหญ่น้ำตาลไซโลสจะถูกเปลี่ยนเป็นไซลิตอลด้วยเอนไซม์ไซโลสรีดักเทส (xylose reductase, XR) จากนั้นไซลิตอลถูกเปลี่ยนเป็นดี-ไซลูโลส (D-xylulose) ด้วยเอนไซม์ไซลิตอลดีไฮโดรจีเนส (xylitol dehydrogenase, XDH) และมีการเติมหมู่ฟอสเฟต (phosphate) โดยเอนไซม์ไซลูโลไคเนส (xylulokinase) ได้ไซลูโลส-5-ฟอสเฟต (xylulose-5-phosphate, X5P) หลังจากนั้น X5P จึงเข้าสู่วิถีเพนโทสฟอสเฟต (Hagerdal และคณะ, 2007)



รูปที่ 2.4 กระบวนการเปลี่ยนน้ำตาลไซโลสเป็นไซลูโลส-5-ฟอสเฟต

ที่มา : Vongsuvanlert และ Tani (1988)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

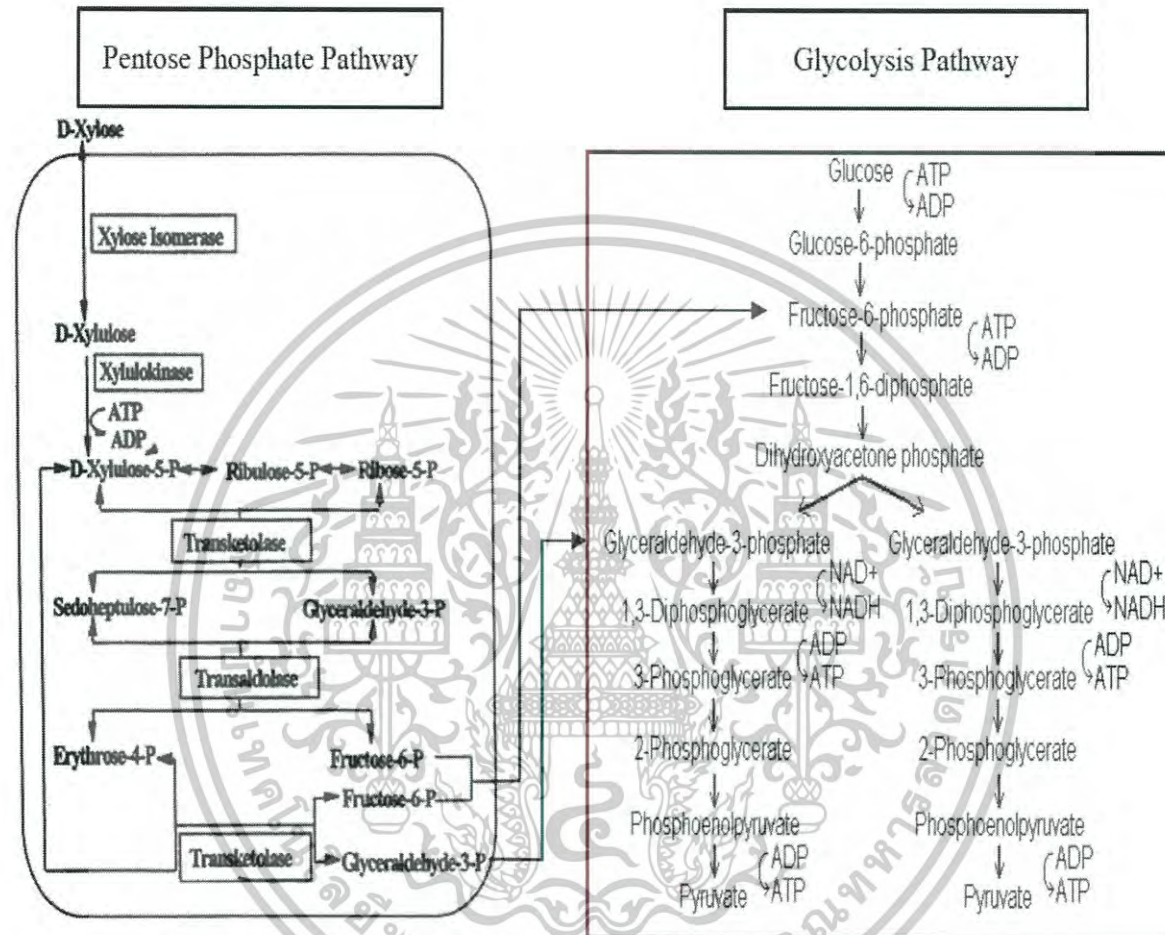


รูปที่ 2.5 วิถีเพนโตสฟอสเฟต (Pentose phosphate pathway)

ที่มา : Nicholas และคณะ (2003)

ในส่วนของแบคทีเรียไซลอสจะถูกเมตาบอลิ์ทเป็นไซลูโลส (Xylulose) ในหนึ่งขั้นตอนโดย เอนไซม์อาคัยไอโซเมอเรส (Isomerase) (Vongsuvanlert และ Tani, 1988) เมื่อน้ำตาลไซลอสถูก เปลี่ยนเป็น ไซลูโลส-5-ฟอสเฟส (Xylulose-5-phosphate, X5P) โดยเอนไซม์ไซลูโลโคเนส (Xylulokinase) มีการใช้พลังงาน ATP 1 โมเลกุล เมื่อได้เซลลูโลส-5-ฟอสเฟต (Cellulose-5-phosphate) แล้วจะเข้าสู่วิถีเพนโตสฟอสเฟตแบบไม่ใช้ออกซิเจน จากนั้นจะมีการเคลื่อนย้าย คาร์บอนสองอะตอมจาก ไซลูโลส-5-ฟอสเฟส (Xylulose-5-phosphate) ไปยังโรโบส-5-ฟอสเฟต (Ribose-5-phosphate) กลายเป็น เซโดเฮปทูลอส-7-ฟอสเฟต (Sedoheptulose-7-phosphate) ซึ่งมีคาร์บอน 7 อะตอม และ กลีเซอรอลดีไฮด์-3-ฟอสเฟต (Glyceraldehyde-3-phosphate) มี คาร์บอน 3 อะตอม ตามลำดับ โดยใช้เอนไซม์ทรานคีโตเลส (Transketolase) จากนั้นคาร์บอนสาม อะตอม จะถูกโอนย้ายจากเซโดเฮปทูลอส-7-ฟอสเฟต (Sedoheptulose-7-phosphate) ไปยังกลีเซ อรอลดีไฮด์-3-ฟอสเฟต (Glyceraldehyde-3-phosphate) ซึ่งมีคาร์บอน 3 อะตอม กลายเป็นฟรุก โตส-6-ฟอสเฟต (Fructose-6-phosphate) ซึ่งมีคาร์บอน 6 อะตอม และอิริโทรส-4-ฟอสเฟต (Erythrose-4-phosphate) มีคาร์บอน 4 อะตอม โดยในปฏิกิริยานี้จะเหมือนกับปฏิกิริยาของ เอนไซม์อัลโดเลส (Aldolase) ในวิถีไกลโคไลซิส ซึ่ง Erythrose-4-phosphate จะรวมตัวกับ D-xylulose-5-phosphate จะเร่งปฏิกิริยาด้วยเอนไซม์ทรานคีโตเลส Transketolase กลายเป็นฟรุกโตส-6-ฟอสเฟต Fructose-6-phosphate และกลีเซอรอลดีไฮด์-3-ฟอสเฟต (Glyceraldehyde-3-phosphate) ซึ่งฟรุกโตส-6-ฟอสเฟต (Fructose-6-phosphate) และกลีเซ อรอลดีไฮด์-3-ฟอสเฟต (Glyceraldehyde-3-phosphate) จะเข้าสู่วัฏจักรไกลโคไลซิสต่อไป ดังรูปที่ 2.6 (Glycolysis Pathway) (David และ Michael, 2004)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.6 การหมักน้ำตาลไซโลสด้วยวิธีเพนโตสฟอสเฟตและเข้าสู่วิถีไกลโคไลซิส

ที่มา : Mohagheghi และคณะ (2014)

### 2.2.2.2 การผลิตกรดมาลิกจากวัฏจักรเครบส์ (Kreb's cycle or Tricarboxylic acid cycle)

วัฏจักรเครบส์ เริ่มต้นจากไพรูเวตถูกออกซิไดส์ได้คาร์บอนไดออกไซด์ 1 โมเลกุล และได้สารที่มีหมู่แอซิติล (acetyl group) อีก 1 โมเลกุล ซึ่งทำปฏิกิริยากับโคเอนไซม์เอ (CoA) ได้เป็นแอซิติล-โคเอ (Acetyl-CoA) และเข้าสู่วัฏจักรเครบส์

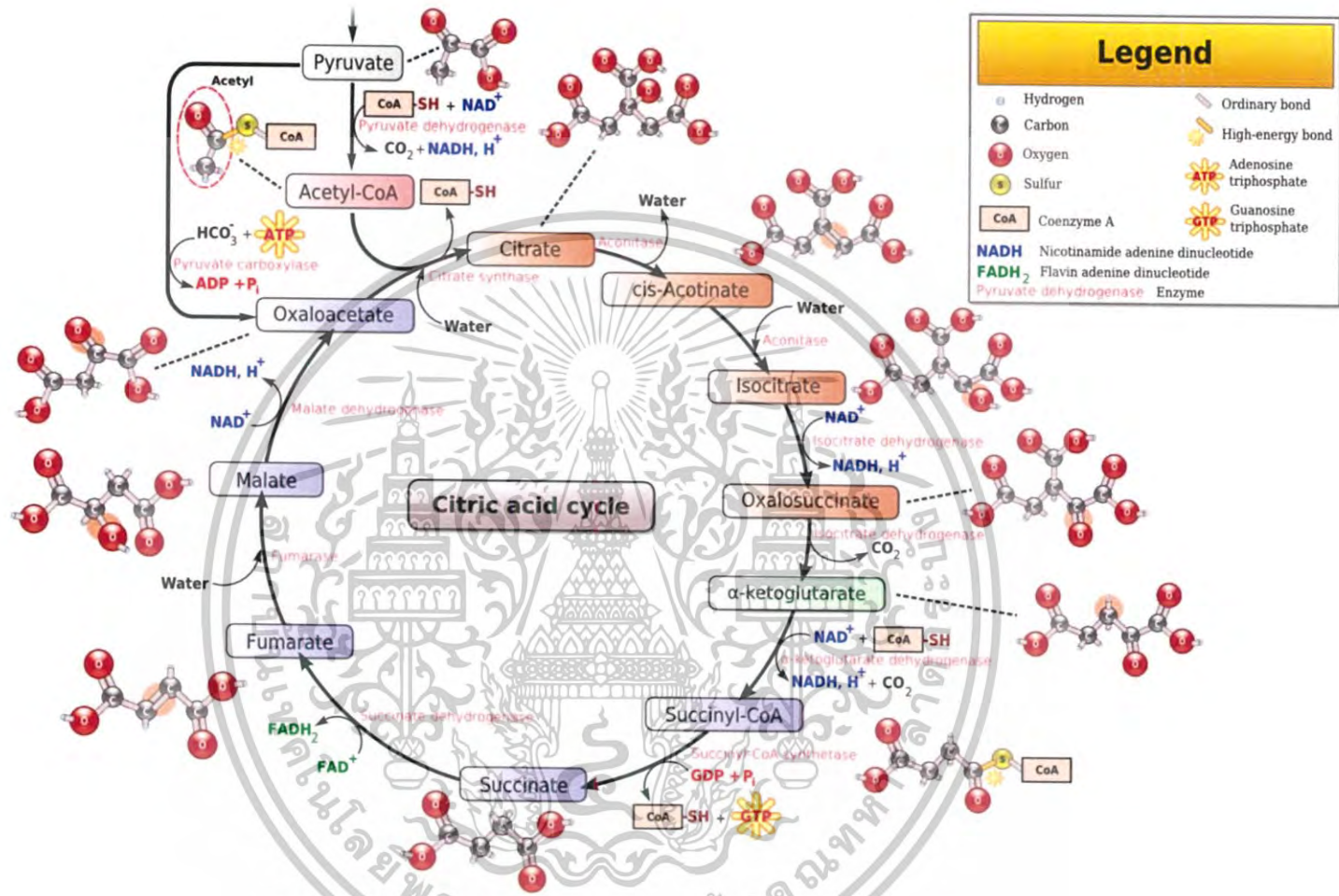
โดยวัฏจักรเครบส์ เริ่มต้นด้วยปฏิกิริยาที่ 1 Acetyl CoA มีคาร์บอน 2 อะตอม เข้ารวมตัวกับกรดออกซาโลแอซิเตรต (Oxaloacetate) มีคาร์บอน 4 อะตอม และน้ำเป็นซิเตรต (Citrate) มีคาร์บอน 6 อะตอม โดยอาศัยการเร่งการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ซิเตรตซินเทส (Citrate synthase) ปฏิกิริยาที่ 2 ซิเตรตมีการสูญเสียน้ำกลายเป็นกรดซิส-แอคอนิติก (Cis-aconitic acid) มีคาร์บอน 6 อะตอม โดยอาศัยการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ซิสแอคอนิตาส (Cisaconitase) แล้วรวมตัวกับน้ำเปลี่ยนไปเป็นกรดไอโซซิเตรตริก (Isocitric acid) โดยอาศัยเอนไซม์ตัวเดิม มีคาร์บอน 6 อะตอม ปฏิกิริยาที่ 3 กรดไอโซซิเตรตริก (Isocitric acid) จะมีการสูญเสีย  $2H^+$  ได้เป็นกรดแอลฟา-คีโตกลูตาริก ( $\alpha$ -Ketoglutaric acid) มีคาร์บอน 5 อะตอม และก๊าซ  $CO_2$  โดย  $H^+$  จะมีสาร  $NADH^+$  มารับกลายเป็น  $NADH^+H^+$  เอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาของขั้นตอนนี้คือ ไอโซซิเตรตดีไฮโดรจีเนส (Isocitrate dehydrogenase) ปฏิกิริยาที่ 4 กรดแอลฟา-คีโตกลูตาริก ( $\alpha$ -Ketoglutaric acid) มีคาร์บอน 5 อะตอม จะทำปฏิกิริยากับโคเอนไซม์ เอ (coenzyme A) กลายเป็น ซักซินิลโคเอนไซม์ เอ (Succinyl CoA) มีคาร์บอน 4 อะตอม ในขั้นตอนนี้มีการสร้าง  $CO_2$  และ  $NADH^+H^+$  จาก  $NAD^+$  ด้วย เอนไซม์ที่ทำหน้าที่เร่งการเกิดปฏิกิริยาในขั้นตอนนี้คือ เอนไซม์แอลฟา-คีโตกลูตาเรต ดีไฮโดรจีเนส ( $\alpha$ -Ketoglutarate dehydrogenase) ปฏิกิริยาที่ 5 สารซักซินิลโคเอนไซม์ เอ (Succinyl CoA) มีคาร์บอน 4 อะตอม เป็นสารพลังงานสูงจะแตกตัวเป็นกรดซักซินิก (Succinic acid) มีคาร์บอน 4 อะตอม และมีการปล่อยพลังงาน GTP ออกมาแล้วเปลี่ยนเป็น ATP โดยการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ซักซินิลโคเอนไซม์ เอ ซินเทส (Succinyl CoA synthase) ปฏิกิริยานี้มีการเติม  $H_2O$  จำนวน 1 โมเลกุล ปฏิกิริยาที่ 6 กรดซักซินิก (Succinic acid) มีคาร์บอน 4 อะตอม จะมีการสูญเสีย  $2H^+$  ได้เป็นกรดฟูมาริก (Fumaric acid) มีคาร์บอน 4 อะตอม ส่วน  $2H^+$  จะมี FAD มารับกลายเป็น  $FADH_2$  ปฏิกิริยาที่ 7 กรดฟูมาริก (Fumaric acid) จะถูกไฮโดรไลต์เป็นกรดมาลิก (Malic acid) มีคาร์บอน 4 อะตอม โดยมีเอนไซม์ฟูมาเรส (Fumarase) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาและปฏิกิริยาสุดท้าย กรดมาลิก (Malic acid) มีคาร์บอน 4 อะตอม มีการสูญเสีย  $2H^+$  ให้  $NAD^+$  กลายเป็นกรด กรดออกซาโลแอซิเตรต (Oxaloacetate) มีคาร์บอน 4 อะตอม โดยมีเอนไซม์มาเลตดีไฮโดรจีเนส (Malate-dehydrogenase) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา กรดออกซาโลแอซิเตรตที่ได้จากปฏิกิริยาในขั้นตอนนี้จะไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้จำนวนที่พอควรตามที่กำหนดไว้ ไม่อนุญาตให้ใช้ซ้ำโดยไม่ขออนุญาต  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รวมตัวกับแอสติลโคเอนไทม์ เอ (Acetyl-CoA) แล้วกลับเข้าสู่วัฏจักรเครปส์ในรอบถัดๆไป ดังรูป 2.7 ขเมื่อได้กรดมาลิกแล้วจะมีการส่งออกสู่ภายนอกเซลล์ทำให้กรดมาลิกนั้นถูกปะปนอยู่ในน้ำเลี้ยง (Garrett และคณะ, 2008)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.7 วัฏจักรเครบส์ (Krebs cycle or Tricarboxylic acid cycle)

ที่มา : Garrett และคณะ (2008)

### 2.2.2.3 การผลิตกรดมาลิกจากวิธีอื่น ๆ

นอกจากกรดมาลิกสามารถผลิตได้จากวัฏจักรเครปส์แล้วยังสามารถผลิตโดยวิธีต่างๆดังนี้

วิธีที่ 1 : วัฏจักรกรดซิตริกแบบผันกลับ เกิดการเปลี่ยนไพรูเวตเป็นออกซาโลอะซิเตตโดยเอนไซม์ไพรูเวตคาร์บอกซิเลส จากนั้นจะเปลี่ยนเป็นกรดมาลิกโดยเอนไซม์มาเลตดีไฮโดรจีเนส ซึ่งวิธีนี้จะมีอะดีโนซีนไตรฟอสเฟตเป็นสารตัวกลาง และมีการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์เข้ามาาร่วมด้วย ได้ผลผลิตเป็นกรดมาลิกทางทฤษฎีสูงสุดที่ 2 โมล ต่อกลูโคส 1 โมล ดังรูป 2.8 (Knuf, 2014)

#### ① Oxaloacetate reduction $Y_{op}^{max}: 2 \text{ mol mol}^{-1}$



รูปที่ 2.8 การผลิตมาเลตตามวัฏจักรกรดซิตริกแบบผันกลับ แล้วส่งออกสู่ภายนอกเซลล์

ที่มา : Knuf (2014)

วิธีที่ 2 : วัฏจักรไกลออกซีเลต (Glyoxylate cycle) วัฏจักรไกลออกซีเลตเป็นกระบวนการสังเคราะห์กรดมาลิกหรือมาเลต 1 โมเลกุล จากอะซิติลโคเอนไซม์ เอ 2 โมเลกุล ประกอบไปด้วย 4 ขั้นตอน ดังนี้

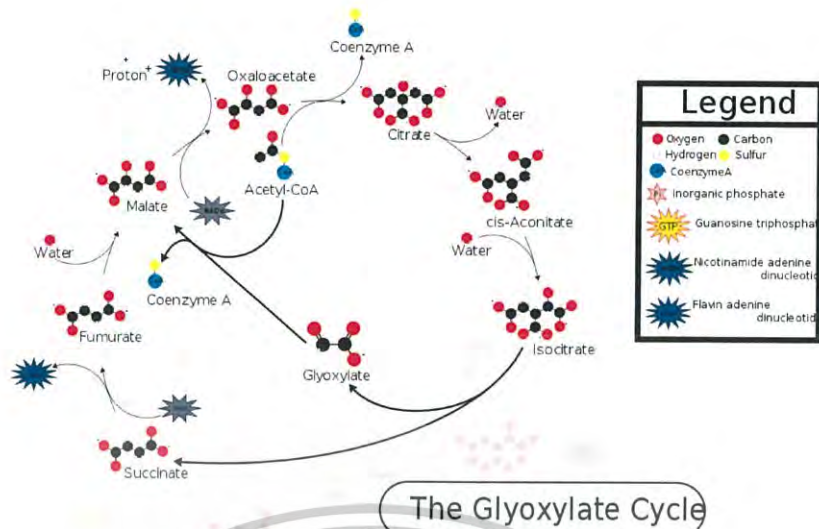
ขั้นตอนที่ 1 การเกิดปฏิกิริยาcondensation (Condensation) โดยอะซิติลโคเอนไซม์ เอ (Acetyl-CoA) จะรวมตัวกับออกซาโลอะซิเตต (Oxaloacetate) เป็นซิเตรต (Citrate) โดยเอนไซม์ซิเตรต ซินเทส (Citrate synthase)

ขั้นตอนที่ 2 การเกิดปฏิกิริยาเปลี่ยนซิเตรตเป็นไอโซซิเตรต (Isocitrate) โดยเอนไซม์อะโคนิเตส (Aconitase)

ขั้นตอนที่ 3 การเกิดปฏิกิริยาเปลี่ยนไอโซซิเตรตเป็นซักซิเนต (Succinate) และไกลออกซีเลต (Glyoxylate) โดยเอนไซม์ไอโซซิเตรต ไลเอส (Isocitrate lyase)

ขั้นตอนที่ 4 การเกิดปฏิกิริยาcondensation (Condensation) โดยอะซิติลโคเอนไซม์ เอ (Acetyl-CoA) จะรวมตัวกับไกลออกซีเลต ได้เป็นมาเลต (Malate) ดังรูป 2.9 (Knuf, 2014)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

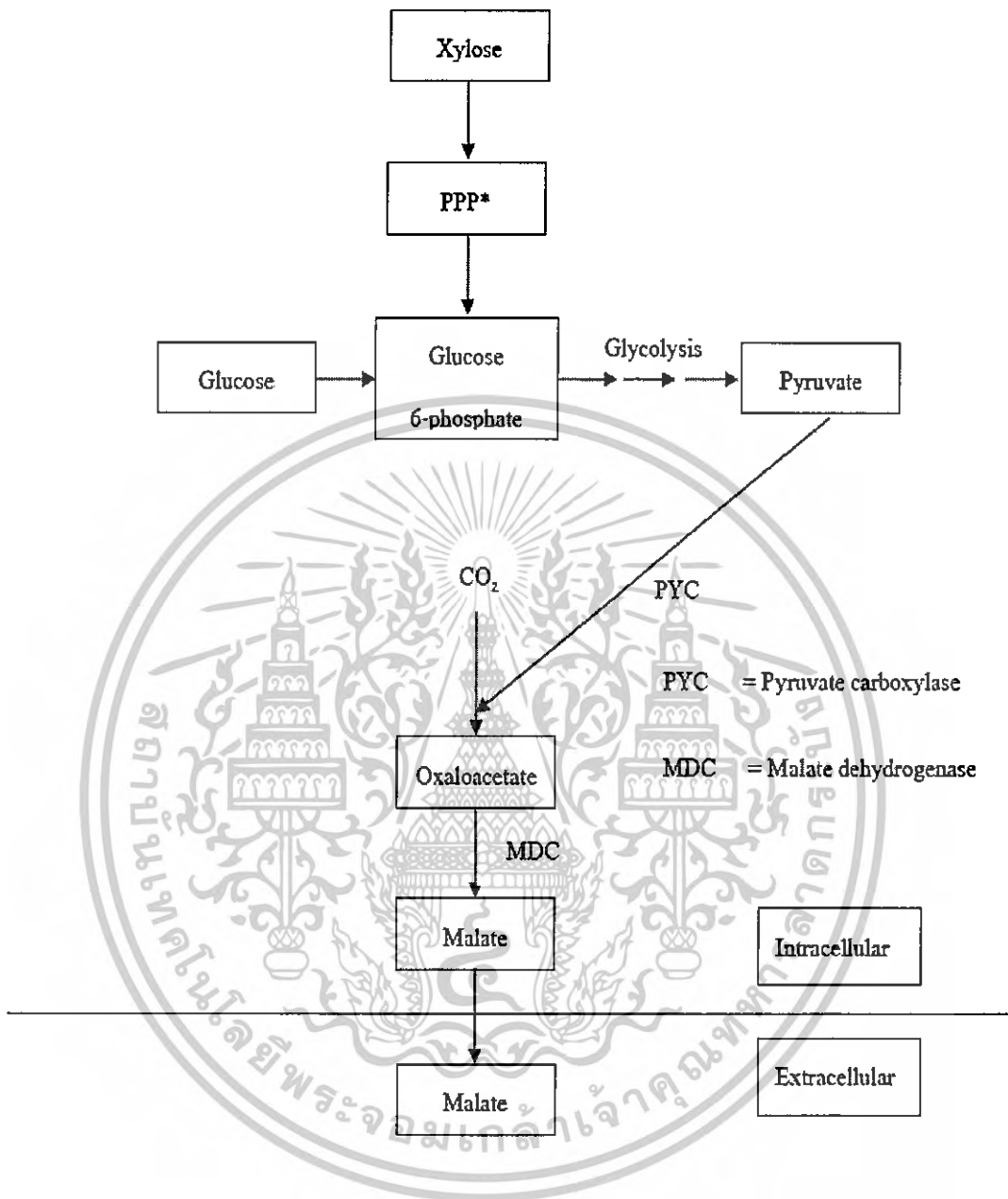


รูปที่ 2.9 การผลิตกรดมาลิกโดยวัฏจักรไกลออกซีเลต

ที่มา : Knuf (2014)

วิธีที่ 3 การสร้างมาเลตเกิดจากปฏิกิริยาคาร์บอกซิเลชันของไพรูเวต โดย biotin-dependent pyruvate carboxylase โดยในปฏิกิริยาคาร์บอนไดออกไซด์เพื่อช่วยทำงานในปฏิกิริยา pyruvate carboxylase เพื่อเปลี่ยนไปเป็นออกซาโลแอซีเทต ต่อมาเกิดปฏิกิริยารีดักชันของออกซาโลแอซีเทตได้เป็นมาเลต ดังรูป 2.10 (Knuf, 2014)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.10 เกิดจากปฏิกิริยาคาร์บอกซิเลชันของไพรูเวตได้เป็นมาเลต

ที่มา : Goldberg และคณะ (2006)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.3 จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตกรดมาลิก

*Aspergillus flavus* เป็นจุลินทรีย์ชนิดแรกที่ถูกรายงานว่าสามารถผลิตกรดมาลิกได้ โดยมีการศึกษาการผลิตกรดมาลิกโดยเชื้อ *A. flavus* ประกอบด้วย 2 ระยะ คือ ระยะการเจริญเติบโตและระยะการผลิตกรด ในระยะที่ 2 กลูโคสส่วนมากจะถูกเปลี่ยนเป็นกรดมาลิก และกรดซัคซินิคซึ่งเป็นผลผลิตที่ได้เป็นจำนวนมากอันดับ 2 ตามด้วยกรดฟูมาริก ซึ่งเชื้อ *A. flavus* จะปล่อยกรดจากเส้นใยออกมาสู่อาหารเลี้ยงเชื้อ การปล่อยผลิตภัณฑ์ออกมาสู่ภายนอกเซลล์ทำให้กรดทำปฏิกิริยากับแคลเซียมคาร์บอเนตที่มีในอาหารได้ผลึกแคลเซียมที่ไม่ละลายน้ำเป็นผลึกอยู่บนเส้นใย (Abe และคณะ, 1962 ; Peleg และคณะ, 1988 ; Battat และคณะ, 1991) นอกจากนี้ยังมีรายงานอื่น ๆ ที่นำสายพันธุ์ต่างๆไปผลิตกรดมาลิก เช่น *Aspergillus flavus*, *Rhizopus arrhizus*, *Paecilomyces varioti*, *Monascus araneosus* และ *Schizophyllum commune* เป็นต้น

นอกจากเชื้อสายพันธุ์ข้างต้นแล้ว ยังมีเชื้อสายพันธุ์อื่นๆที่สามารถผลิตกรดมาลิกได้ โดยในปี 2016 Zou และคณะ ได้ทำการศึกษาการผลิตกรดมาลิก (Poly-malic) ที่ใช้เชื้อรา *Aureobasidium pullulans* สายพันธุ์ YJ 6-11 ซึ่งมีแหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน คือ กลูโคส ซูโครส ไชโลส ฟรุกโทส และมอลโทส เลี้ยงที่สภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 220 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 4 วัน และใช้  $\text{CaCO}_3$  เป็นสารปรับความเป็นกลางของอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าสามารถผลิตกรดโพลีมาลิก (Polymalic) ได้สูงที่สุด คือ  $28.30 \pm 0.08$  กรัมต่อลิตร เมื่อใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน นอกจากนี้ยังมีจุลินทรีย์สายพันธุ์อื่น ๆ ที่สามารถผลิตกรดมาลิกได้ ดังตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 การผลิตกรดมาลิกโดยกระบวนการหมักจากเชื้อรา

ชนิดของเชื้อรา	กรดมาลิก (กรัมต่อ ลิตร)	อัตราการผลิต (กรัมต่อลิตรต่อ ชั่วโมง)	อ้างอิง
<i>Aspergillus flavus</i>	60	0.1	Abe และคณะ, (1962)
	36	0.19	Peleg และคณะ, (1988)
	113	0.59	Battal และคณะ, (1991)
<i>Monascus araneosus</i>	28	0.23	Lumyong และ Tomita, (1993)
<i>Rhizopus arrhizus</i>	48	0.34	Takao และคณะ, (1983)
<i>Paecilomyces varioti</i>	48	0.34	Takao และคณะ, (1983)
<i>Schizophyllum commune</i>	18	0.16	Kawagoe และคณะ, (1997)
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 9142	113	0.1	West, (2011)
<i>Zygosocchoromyces rouxii</i>	75	0.52	Taing และ Taing, (2007)
<i>Monascus areneosus</i> ST91	28	0.23	Lumyong และ Tomita, (1993)
<i>Aurebasidium pullulans</i> ZD-3d	65.7	0.35	Zhang และคณะ, (2011a)
<i>Aurebasidium pullulans</i> CBS591.75	16.0	0.06	Liu และ Steinbuchel, (1997)

ที่มา : ดัดแปลงจาก Zelle และคณะ (2008)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำหรับตัวอย่างการหมักกรดมาลิกโดยอาศัยแบคทีเรียที่เรี่ยนั้นเทคนิคที่สำคัญที่สุดคือการตรึงเซลล์ของเชื้อ *Brevibacterium ammoniagenes* หรือเชื้อ *Brevibacterium flavum* ซึ่งสามารถผลิตเอนไซม์ fumarase ที่มีกิจกรรมสูง โดยเอนไซม์ fumarase นั้นเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาเพื่อเปลี่ยนกรดฟูมาริกไปเป็นกรดมาลิก (Mondala และคณะ, 2015)

Yamamoto และคณะ (1976) ได้ทำการทดลองผลิตแอล-กรดมาลิก (L-malic acid) จากกรดฟูมาริกแบบต่อเนื่อง โดยเชื้อ *B. ammoniagenes* IAM 1645 และจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ที่ถูกตรึงในพอลิอะคริลาไมด์เจล เมื่อมีการแสดงอัตราการผลิตกรดมาลิก ของแบคทีเรียชนิดต่างๆ ที่ถูกตรึงในพอลิอะคริลาไมด์ โดยเชื้อ *B. ammoniagenes* IAM 1645 มีอัตราการผลิตสูงที่สุดทั้งในปฏิกิริยาที่มีและไม่มี cetylpyridinium chloride (CPC) ผสมอยู่ (ตารางที่ 2.3) โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับกิจกรรมของเอนไซม์ fumarase คือ 60 องศาเซลเซียส และค่าพีเอช ที่เหมาะสมมีช่วงกว้างคือ 6.5-8.0

ตารางที่ 2.3 ปริมาณกรดมาลิกที่ถูกผลิตขึ้นโดยเซลล์แบคทีเรียชนิดต่างๆ ที่ถูกตรึงในพอลิอะคริลาไมด์เจล

ชนิดของแบคทีเรีย	อัตราการผลิตกรดมาลิก (L-malic acid) (มิลลิโมล/ชั่วโมง/กรัมเซลล์)	
	ไม่เติม CPC	เติม CPC <sup>a</sup>
<i>Brevibacterium ammoniagenes</i> IAM 1645	0.49	3.37
<i>Corynebacterium qui</i> IAM 1038	0.09	0.42
<i>Escherichia coli</i> ATCC 11303	0.27	0.32
<i>Micrabacterium flavum</i> IAM 1642	0.20	0.48
<i>Proteus vulgaris</i> IFO 3045	0.16	0.26

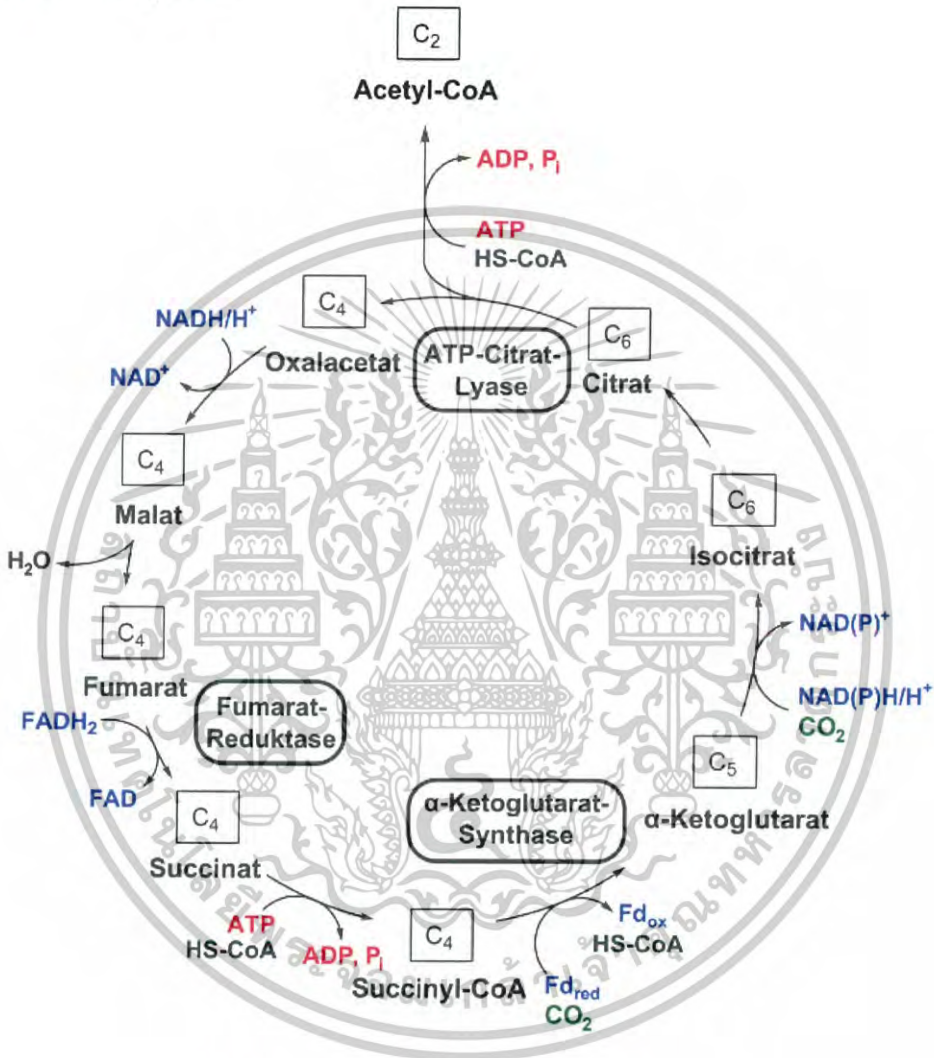
CPC : Cetylpyridinium chloride คือ สารประกอบประเภทเกลือชนิดหนึ่งที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย

CPC<sup>a</sup> : เติม Cetylpyridinium chloride ที่ความเข้มข้น ร้อยละ 0.02

ที่มา : ดัดแปลงจาก Yamamoto และคณะ (1976)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นอกจากเชื้อราและแบคทีเรียแล้วยีสต์ก็เป็นจุลินทรีย์อีกประเภทหนึ่งที่มีความสามารถสูงในการผลิตกรดมาลิกผ่านวัฏจักรกรดไตรคาร์บอกซิลิกแบบผันกลับ (rTCA cycle) ที่บริเวณไซโตซอล (Cytosol) และไมโทคอนเดรีย (Mitochondria) ซึ่งหากวัฏจักร rTCA (Reverse Tricarboxylic acid) ลดลงส่งผลทำให้ มีการผลิตกรดมาลิกบริเวณไมโทคอนเดรีย (Mitochondria) เพิ่มมากขึ้น (Dai และคณะ, 2018) ดังรูป 2.11



รูปที่ 2.11 วัฏจักร rTCA (Reverse Tricarboxylic acid)

ที่มา : Buchanan และคณะ (1990)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในปี 1997 Pines และคณะ ได้ศึกษาการผลิตกรดมาลิกด้วยเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆรวมทั้งเชื้อ *Sacchromyces cerevisiae* โดยสามารถผลิตกรดมาลิกได้ถึง 12 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้ในปี 2007 Taing และ Taing ได้ทำการคัดแยกเชื้อยีสต์ *Zygasaccharomyces rouxii* จากธรรมชาติ และมีความสามารถผลิตกรดมาลิกได้ถึง 75 กรัมต่อลิตร ในอาหารที่มีกลูโคสความเข้มข้น 300 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนอีกด้วย ดังตารางที่ 2.4

ตารางที่ 2.4 การผลิตกรดมาลิกโดยกระบวนการหมักจากยีสต์

ชนิดของยีสต์	กรดมาลิก (กรัมต่อ ลิตร)	อัตราการผลิต (กรัมต่อลิตร ต่อชั่วโมง)	อ้างอิง	
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	75	0.54	Taing และ Taing, (2007)	
	1	0.01	Fatichenti และคณะ, (1984)	
	<i>Sacchromyces cerevisiae</i>	2	-	Schwartz และ Radler, (1988)
		6	0.18	Pines และคณะ, (1996)
		12	0.38	Pines และคณะ, (1997)
59		0.19	Zelle และคณะ, (2008)	

ที่มา : ดัดแปลงจาก Zelle และคณะ (2008)

เชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* เป็นยีสต์สายพันธุ์ที่ใช้เทคโนโลยีพันธุวิศวกรรมเพื่อปรับปรุงพันธุ์ ที่ยีน *fum1* (fumarase gene) ถูกใช้ในกระบวนการตรึงเซลล์เพื่อเปลี่ยนกรดฟูมาริกเป็นกรดมาลิกโดยไม่ต้องสร้างกรดซักซินิค ยีสต์สายพันธุ์ที่ได้รับการปรับปรุงสายพันธุ์แล้วจะมีการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์สูงมาก โดยการชักนำการแสดงออกของเอนไซม์ fumarase ซึ่งสามารถเปลี่ยนกรดฟูมาริกไปเป็นกรดมาลิกได้ถึงร้อยละ 88 และมีอัตราการเปลี่ยน 80.4 มิลลิโมลของกรดฟูมาริกต่อชั่วโมงต่อกรัมเซลล์เปียก (Peleg และคณะ, 1990) นอกจากนี้ *S.cerevisiae* ยังมีแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น ๆ ที่ใช้เทคโนโลยีพันธุวิศวกรรมในการปรับปรุงพันธุ์เพื่อให้ผลิตกรดมาลิกได้สูงขึ้น ดังตาราง 2.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.5 การผลิตกรดมาลิกจากจุลินทรีย์ที่ใช้เทคโนโลยีพันธุวิศวกรรมในการปรับปรุงสายพันธุ์

Engineered producers	กรดมาลิก (กรัมต่อ ลิตร)	อัตราการผลิต (กรัมต่อลิตร ต่อชั่วโมง)	อ้างอิง
<i>Escherichia coli</i> WGS - 10	9.25	0.74	Moon และคณะ, (2008)
<i>Escherichia coli</i> XZ658	34	0.47	Zhang และคณะ, (2011)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	59	0.19	Zelle และคณะ, (2008)

ที่มา : ดัดแปลงจาก Zou และคณะ (2013)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.4 วัสดุลิกโนเซลลูโลส

วัสดุลิกโนเซลลูโลส เป็นวัตถุดิบราคาถูก ซึ่งเป็นวัสดุเหลือใช้จากอุตสาหกรรมอาหาร การเกษตร ฟาร์มปศุสัตว์ เช่น ฟางข้าว เปลือกถั่ว ชานอ้อย และเปลือกมะพร้าว เป็นต้น วัสดุเหล่านี้สามารถนำกลับมาใช้ใหม่เพื่อผลิตพลังงาน และผลิตภัณฑ์อื่น ๆ ที่มีประโยชน์ต่างๆได้ โดยวัสดุลิกโน-เซลลูโลสนั้นจะประกอบด้วยพอลิเมอร์ 3 ชนิด คือ เซลลูโลส (cellulose) เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) และลิกนิน (lignin) เป็นองค์ประกอบหลัก ดังแสดงในตารางที่ 2.5

ตารางที่ 2.6 ปริมาณของเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินในวัสดุลิกโนเซลลูโลสต่างๆ

วัสดุลิกโนเซลลูโลส	เซลลูโลส (ร้อยละ)	เฮมิเซลลูโลส (ร้อยละ)	ลิกนิน (ร้อยละ)
เปลือกข้าวโพด*	29 - 34.2	33.5 - 36	32.3 - 35
ลำต้นไม้เนื้อแข็ง	40 - 55	24 - 40	18 - 25
ลำต้นไม้เนื้ออ่อน	45 - 50	25 - 35	25 - 35
เปลือกถั่ว	25 - 30	25 - 30	30 - 40
แกนฝักข้าวโพด	45	35	15
หญ้า	25 - 40	35 - 50	10 - 30
กระดาษ	85 - 99	0	0 - 15
ฟางข้าวสาลี	30	50	15
ใบไม้	15 - 20	80 - 85	0
ใยเมล็ดฝ้าย	80 - 95	5 - 20	0
หญ้าพันธุ์ Coastal Bermuda	25	35.7	6.4
หญ้าพันธุ์ Switch	45	31.4	12.0

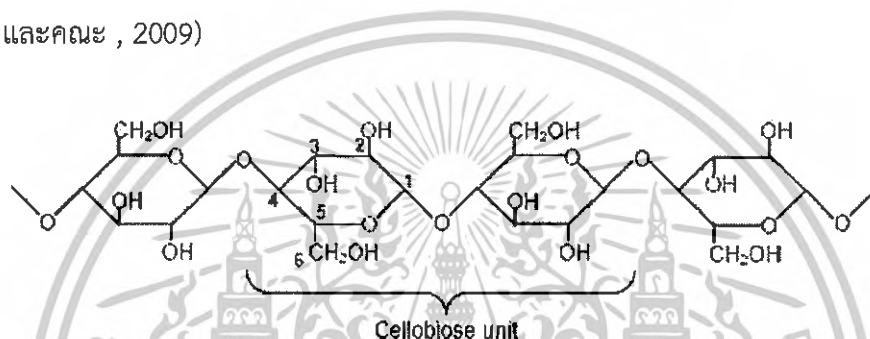
ที่มา : ดัดแปลงจาก Sun และ Cheng (2002)

\*หมายเหตุ เปลือกข้าวโพดดัดแปลงจาก Barl และคณะ (1991)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 2.4.1 องค์ประกอบและโครงสร้างของวัสดุลิกโนเซลลูโลส

เซลลูโลส เป็นส่วนประกอบโครงสร้างที่สำคัญในผนังเซลล์ของพืช โครงสร้างของเซลลูโลส แสดงในรูปที่ 2.13 พอลิเมอร์ของเซลลูโลสคือสายของกลูโคสที่เชื่อมกันด้วยพันธะ  $\beta$ -(1,4)-glycosidic ต่อกันเป็นสายยาวตรง โดยมีหน่วยซ้ำๆกันที่เรียกว่า เซลโลไบโอส ( cellobiose ) พอลิเมอร์เซลลูโลสสายยาวนั้นจะเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไฮโดรเจนและแรงแวนเดอร์วาลส์ โดยเซลลูโลสจะมีส่วนที่เป็นผลึก (crystalline region) ซึ่งเป็นบริเวณที่มีโครงสร้างเป็นระเบียบ และส่วนที่เป็น amorphous region ซึ่งเป็นบริเวณที่ไม่มีความเป็นระเบียบ นอกจากนี้ยังพบว่าเซลลูโลสแบบ amorphous นั้นมีความไวต่อการย่อยสลายด้วยเอนไซม์จึงเป็นส่วนที่ง่ายต่อการถูกย่อยด้วยเอนไซม์ (Kumar และคณะ , 2009)



รูปที่ 2.12 โครงสร้างของเซลลูโลส  
ที่มา : Kumar และคณะ ( 2009 )

เฮมิเซลลูโลส เป็นองค์ประกอบหนึ่งของผนังเซลล์พืช มีหลายชนิดขึ้นอยู่กับน้ำตาลที่เป็นส่วนประกอบ ได้แก่ ไซแลน กลูคูโรโนไซแลน อะระบิโนไซแลน กลูโคแมนแนน และ ไซโลกลูแคน ซึ่งคุณสมบัติที่แยกความแตกต่างของเฮมิเซลลูโลสออกจากเซลลูโลส คือเฮมิเซลลูโลสมีโครงสร้างที่เป็นกิ่งก้านประกอบด้วยน้ำตาลชนิดต่างๆ ได้แก่ น้ำตาลเพนโทส เช่น ไซโลส แรมโนส และอะราบิโนส เป็นต้น น้ำตาลเฮกโซส เช่น กลูโคส แมนโนส และกาแล็กโทส เป็นต้น และมีกรดยูโรนิก เช่น 4-*o*-methylglucuronic acid, D-glucuronic acid และ D-galactouronic acid เป็นส่วนประกอบสายหลักของเฮมิเซลลูโลสเป็นโฮโมพอลิเมอร์ หรือเฮเทอโรพอลิเมอร์ที่เชื่อมกับกิ่งก้านด้วยพันธะ  $\beta$ -(1,4)-glycosidic หรือ  $\beta$ -(1,3)-glycosidic ในบางครั้ง (Kumar และคณะ , 2009)

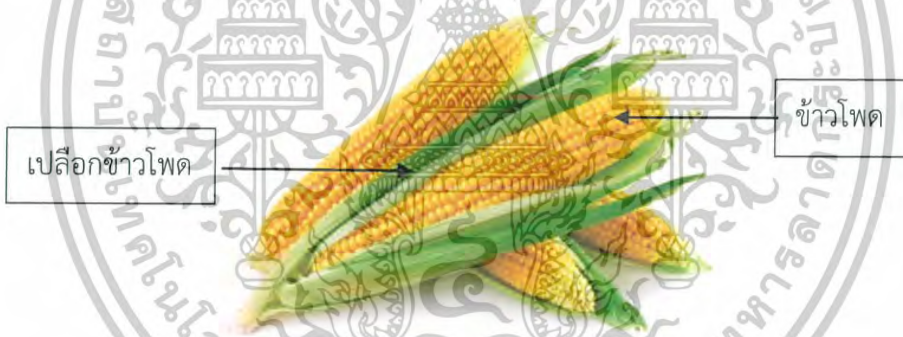
ลิกนิน เป็นโครงสร้างที่มีขนาดใหญ่และซับซ้อน พอลิเมอร์จะเชื่อมกันด้วยมอนอเมอร์ฟีนอลิก พบในผนังเซลล์ของพืชทำให้เนื้อเยื่อมีความแข็งแรง ไม่ยอมให้สารซึมผ่าน และมีความต้านทานต่อจุลินทรีย์ มอนอเมอร์ของลิกนินคือฟีนิลพรพีนอลแอลกอฮอล์ ประกอบด้วย coniferyl alcohol (guaiacyl propanol), coumaryl alcohol (*p*-hydroxyphenyl propanol) และ sinapyl alcohol (1,2,4-trimethoxy-5-propenylbenzene) นอกจากนี้ยังมีกรดยูโรนิกและกรดกลูคูโรนิกเป็นองค์ประกอบของลิกนิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

alcohol (syringyl alcohol) และโดยทั่วไปแล้ว ไม้ล้มลุก เช่น หญ้าจะมีปริมาณลิกนินต่ำสุด ในขณะที่ไม้เนื้ออ่อนมีปริมาณลิกนินสูงสุด (Kumar และคณะ , 2009)

## 2.5 ข้าวโพด

ข้าวโพดมีชื่อวิทยาศาสตร์ คือ *Zea mays* Linn. วงศ์ Graminales เป็นพืชล้มลุกตระกูลหญ้า มีลักษณะลำต้นสูงโดยเฉลี่ยประมาณ 2.2 เมตร ข้าวโพดมีอายุเก็บเกี่ยวสั้น ส่วนมากจะเก็บในรูปแบบฝักสดเมื่ออายุประมาณ 65-80 วัน (ขึ้นอยู่กับพันธุ์) เป็นพืชที่ปลูกได้ตลอดทั้งปีและปลูกกันทั่วทุกภาคของประเทศ แหล่งเพาะปลูกที่สำคัญของทางภาคเหนือ ได้แก่ เชียงใหม่ เชียงราย ลำพูน และลำปาง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่ หนองคาย นครพนม ภาคกลาง ได้แก่ กาญจนบุรี ราชบุรี นครปฐม และสุพรรณบุรี และภาคใต้ ได้แก่ สงขลา สุราษฎร์ธานี และนครศรีธรรมราช ผลผลิตข้าวโพดส่วนมากประมาณ 75% ของผลผลิตจะถูกนำเข้าสู่โรงงานการแปรรูปเพื่อส่งออกไปต่างประเทศ เช่น ข้าวโพดกระป๋อง หลังจากการเก็บเกี่ยวผลผลิตจะยังคงมีใบและลำต้นเป็นเศษเหลือใช้ทางการเกษตรอยู่จำนวนมาก ในส่วนของฝักหลังจากการแปรรูปก็จะมีเศษเหลือจำพวก เปลือก ฝัก ไหม และ ชัง



รูปที่ 2.13 ลักษณะของข้าวโพด

### 2.5.1 ชนิดของข้าวโพด

ชนิดของข้าวโพดนั้นแบ่งได้ตามประเภทการจำแนก โดยสามารถจัดจำแนกได้ดังนี้

#### 2.5.1.1 การจัดจำแนกชนิดของข้าวโพดตามกลุ่ม

1. ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์หรือข้าวโพดไร่ (Field Corn) ที่รู้จักในปัจจุบันเช่นข้าวโพดหัวบวม (Dent Corn) และข้าวโพดหัวแข็ง (Flint Corn) ซึ่งเป็นการเรียกตามลักษณะเมล็ดข้าวโพดหัวบวมหรือหัวบุบ ข้าวโพดชนิดนี้เมื่อเมล็ดแห้งแล้วตรงส่วนหัวบนสุดจะมีรอยบุบลงไป ซึ่งเป็นส่วนของแป้งสีขาว ข้าวโพดชนิดนี้สำคัญมากและนิยมปลูกกันมากใน ประเทศสหรัฐอเมริกา โดยเฉพาะทางแถบคอร์น

เบลท์ สีของเมล็ดมีตั้งแต่ขาวไปจนถึงเหลือง เนื่องจากมีหลายสายพันธุ์มีโปรตีนน้อยกว่าพวกข้าวโพด  
 เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สิ่งพิมพ์หรือสิ่งพิมพ์อื่น ๆ ที่มีการนำเอาเนื้อหาบางส่วนมาใช้ในการจัดทำเอกสารค่า  
 ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวแข็ง ข้าวโพดหัวแข็ง ข้าวโพดพันธุ์นี้ส่วนบนสุดของเมล็ดมักมีสีเหลืองจัดและเมื่อแห้งจะแข็งมาก ภายในเมล็ดมีสารที่ทำให้ข้าวโพดมีสีเหลืองจัดเป็นสารให้สีที่ชื่อ คริปโตแซนทีน (Cryptoxanthin) สารนี้เมื่อสัตว์ได้รับร่างกายสัตว์จะเปลี่ยนสารนี้ให้เป็นวิตามินเอนอกจากนี้สารนี้ยังช่วยให้ไข่แดงมีสีแดงเข้ม ช่วยให้ไก่มีผิวหนัง ปาก เนื้อ และแข้งมีสีเหลืองเข้มขึ้น เป็นที่นิยมของตลาดโดยเฉพาะแถบอเมริกาส่วนอังกฤษนั้นนิยมใช้ข้าวโพดขาว ประเทศไทยนิยมข้าวโพดเลี้ยงสัตว์แบบที่มีสีเหลืองเข้ม มีการปลูกข้าวโพดเลี้ยงสัตว์เกือบตลอดทั้งปี กระจายในพื้นที่ภาคกลาง ตอนกลางของประเทศ ภาคอีสานตอนบน และภาคเหนือ พื้นที่ปลูกข้าวโพดเลี้ยงสัตว์จำนวนมากได้แก่ น่าน แพร่ เลย อุดรดิตถ์ เพชรบูรณ์ ลพบุรี เชียงใหม่

2. ข้าวโพดหวาน (Sweet Corn) เป็นข้าวโพดที่คนใช้รับประทาน ไม่มีการแปรรูป เมล็ดมักจะใสและเหนียวเมื่อแก่เต็มที่ เพราะมีน้ำตาลมาก ก่อนที่จะสุกจะมีรสหวานมากกว่าชนิดอื่น ๆ จึงเรียกข้าวโพดหวาน มีหลายสายพันธุ์

3. ข้าวโพดคั่ว (Pop Corn) เป็นข้าวโพดที่คนใช้รับประทาน ไม่มีการแปรรูป เมล็ดค่อนข้างแข็ง สีดีและขนาดแตกต่างกัน สำหรับต่างประเทศ ถ้าเมล็ดมีลักษณะแหลมเรียกว่า ข้าวโพดข้าว (Rice Corn) ถ้าเมล็ดกลม เรียกว่า ข้าวโพดไข่มุก (Pearl Corn)

4. ข้าวโพดแป้ง (Flour Corn) เมล็ดมีสีหลายชนิด เช่น ขาว (ขุ่น ๆ หรือปนเหลืองนิด ๆ) หรือสีน้ำเงินคล้ำ หรือมีทั้งสีขาวและสีน้ำเงินคล้ำในฝักเดียวกัน เนื่องจากกลายพันธุ์ พวกที่มีเมล็ดสีคล้ำ และพวกกลายพันธุ์เรียกว่าข้าวโพดอินเดียนแดง (Squaw Corn) หรือเรียกได้อีกชื่อว่าข้าวโพดพันธุ์พื้นเมือง (Native Corn) พวกข้าวโพดสีคล้ำนี้จะมีในอาซิน สูงกว่าข้าวโพดที่มีแป้งสีขาว

5. ข้าวโพดเทียน (Waxy Corn) เป็นข้าวโพดที่คนใช้รับประทานจะมีแป้งที่มีลักษณะเฉพาะคือ นุ่มเหนียวเพราะในเนื้อแป้งจะประกอบด้วยแป้งพวกอะไมโลเพคติน (Amylopectin) ส่วนข้าวโพดอื่น ๆ มีแป้งอะไมโลส (Amylose) ประกอบอยู่ด้วย จึงทำให้แป้งค่อนข้างแข็ง

#### 2.5.1.2 การจำแนกทางพฤกษศาสตร์

การจำแนกแบบนี้ถือเอาลักษณะของแป้ง และเปลือกหุ้มเมล็ดเป็นหลัก จำแนกออกเป็น 7 ชนิด คือ

1. ข้าวโพดหัวบุบ (dent corn) มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า ซี เมย์ส อินเดนทาตา (*Zea mays indentata*) เมล็ดตอนบนมีรอยบุบ เนื่องจากตอนบนมีแป้งอ่อน และตอนข้างๆ เป็นแป้งชนิดแข็ง เมื่อตากเมล็ดให้แห้งแป้งอ่อนจะยุบหดตัวลง จึงเกิดลักษณะหัวบุบดังกล่าว

เอกสารนี้เป็นเอกสารลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี  
 2. ข้าวโพดหัวแข็ง (flint corn) มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า ซี เมย์ส อินดูราตา (*Zea mays indurata*) เมล็ดมีแป้งแข็งห่อหุ้มโดยรอบ หัวเรียบไม่บุบเมล็ดค่อนข้างกลม มีปลูกกันมากในเอเชีย และใช้

อเมริกาใต้ ข้าวโพดไร่ของคนไทย มีนิยมนปลูกกัยอยู่ เป็นชนิดนี้ทั้งสิ้น สีของเมล็ดอาจเป็นสีขาว สีเหลือง สีม่วง หรือสีอื่นแล้วแต่ชนิดของพันธุ์

3. ข้าวโพดหวาน (sweet corn) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า ซี เมย์ส แซคคาราตา (*Zea mays saccharata*) นิยมนปลูกกันอย่างแพร่หลาย เพื่อรับประทานฝักสด เพราะฝักมีน้ำตาลมาก ทำให้มีรสหวาน เมื่อแก่เต็มที่หรือแห้ง เมล็ดจะหดตัวเหี่ยวยุบ

4. ข้าวโพดคั่ว (pop corn) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า ซี เมย์ส อีเวอร์ธา (*Zea mays everta*) เมล็ดมีขนาดค่อนข้างเล็ก มีแป้งประเภทแข็งอยู่ใน ภายนอกห่อหุ้มด้วยเยื่อที่เหนียว และยึดตัวได้ เมล็ดมีความชื้นภายในอยู่พอสมควร เมื่อถูกความร้อน จะเกิดแรงดันภายในเมล็ดระเบิดตัวออกมา เมล็ดอาจมีลักษณะกลมหรือหัวแหลมก็ได้ มีสีต่างๆ กัน เช่น เหลือง ขาว ม่วง

5. ข้าวโพดข้าวเหนียว (waxy corn) ชื่อวิทยาศาสตร์ว่า ซี เมย์ส เซอราทีนา (*Zea mays ceratina*) เมล็ดมีแป้งอ่อนคล้ายแป้งมันสำปะหลัง นิยมนปลูก เพื่อรับประทานฝักสดคล้าย ข้าวโพดหวานแม้จะไม่หวานมาก แต่เมล็ดนิ่ม รสอร่อย ไม่ติดฟัน เมล็ดมีสีต่างๆ กัน เหลือง ขาว ส้ม ม่วง หรือมีหลายสีในฝักเดียวกัน

6. ข้าวโพดแป้ง (flour corn) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า ซี เมย์ส อะมิโลเซีย (*Zea mays amylocea*) เมล็ดประกอบด้วย แป้งชนิดอ่อนมาก เมล็ดค่อนข้างกลมหัวไม่บุบ หรือบุบเล็กน้อย นิยมนปลูกในอเมริกาใต้ อเมริกากลาง และสหรัฐอเมริกา ชาวอินเดียนแดงนิยมนปลูกไว้รับประทานเป็นอาหาร

7. ข้าวโพดป่า (pod corn) มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า ซี เมย์ส ทูนิกา (*Zea mays tunica*) มีลักษณะใกล้เคียงข้าวโพดพันธุ์ป่า มีลำต้น และฝักเล็กกว่าข้าวโพดธรรมดา ขนาดเมล็ดค่อนข้างเล็ก เท่าๆ กับเมล็ดข้าวโพดมีขั้วเปลือกหุ้มทุกเมล็ด และยังมีเปลือกหุ้มฝักอีกชั้นหนึ่งเหมือนข้าวโพดธรรมดาทั่วไป เมล็ดมีลักษณะต่างๆ กัน ข้าวโพดชนิดนี้ไม่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ ปลูกไว้เพื่อการศึกษาเท่านั้น

### 2.5.1.3 การจำแนกตามวัตถุประสงค์ของการปลูก

อาจจำแนกออกได้เป็น 4 ชนิด คือ

1. ข้าวโพดใช้เมล็ด (grain corn) ปลูกเพื่อเก็บเมล็ดแก้ไข้เป็นอาหารสัตว์ และมนุษย์ หรือทำอุตสาหกรรมอย่างอื่น

2. ข้าวโพดหมัก (silage corn) ปลูกเพื่อตัดต้นสดมาหมักใช้เป็นอาหารสัตว์

3. ข้าวโพดอาหารสัตว์ (fodder corn) ปลูกเพื่อตัดต้นสดไปใช้เลี้ยงสัตว์

เอกสารนี้เป็นเอกสารทรัพย์สินทางปัญญาของกรมส่งเสริมการค้าระหว่างประเทศ กระทรวงพาณิชย์ หากมีข้อสงสัยหรือต้องการข้อมูลเพิ่มเติม กรุณาไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. ข้าวโพดฝักอ่อน (baby corn) ในประเทศไทยนิยมปลูกเพื่อเก็บฝักอ่อนไปใช้ในการปรุงอาหาร

#### 2.5.2 สถานการณ์การผลิตข้าวโพดในประเทศไทย ปีเพาะปลูก 2550-2556

เนื้อที่เพาะปลูก ปี 2550/51-2554/55 มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นจาก 6.36 ล้านไร่ในปี 2550/51 เป็น 7.26 ล้านไร่ในปี 2554/55 หรือเพิ่มขึ้นร้อยละ 3.83 ต่อปี เนื่องจากราคาข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ อยู่ในเกณฑ์ดีจึงทำให้เกษตรกรขยายเนื้อที่เพาะปลูก รวมทั้งมีการปลูกทดแทนมันสำปะหลัง ในเนื้อที่ที่เกิดเพลี้ยแป้งสีชมพูระบาด ส่งผลให้ผลผลิตเพิ่มขึ้นจาก 3.89 ล้านตันในปี 2550/51 เป็น 4.78 ล้านตัน ในปี 2554/55 หรือเพิ่มขึ้นร้อยละ 5.61 ต่อปี สำหรับผลผลิตต่อไร่เพิ่มขึ้นจาก 611 กิโลกรัมในปี 2550/51 เป็น 659 กิโลกรัมในปี 2554/55 หรือเพิ่มขึ้นร้อยละ 1.76 ต่อปี เนื่องจากสภาพดินฟ้าอากาศเอื้ออำนวย ต่อการเพาะปลูก (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์)

ความต้องการใช้ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ ปี 2550/51-2554/55 มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นจาก 3.96 ล้านตันในปี 2550/51 เป็น 4.36 ล้านตันในปี 2554/55 หรือเพิ่มขึ้นร้อยละ 2.92 ต่อปี เนื่องจาก ความต้องการใช้ในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์มีมากขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งในอาหารไก่เนื้อ ซึ่งเป็นผลสืบเนื่องมาจากการปรับเปลี่ยนรูปแบบส่งออกจากไก่สดเป็นไก่แปรรูป จึงไม่มีการปนเปื้อนของเชื้อใช้หัวตกร ซึ่งตลาดต่างประเทศมีความมั่นใจในคุณภาพและมาตรฐานความปลอดภัยด้านอาหารของไทย ทำให้สามารถส่งออกไก่เนื้อและผลิตภัณฑ์ได้เพิ่มขึ้น (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์)

ในขณะที่เนื้อที่เพาะปลูกรวมทั้งประเทศปี 2556 มีประมาณ 7.37 ล้านไร่ เพิ่มขึ้นจากปี 2555 ร้อยละ 3 โดยมีผลผลิตรวมประมาณ 4.985 ล้านตัน และให้ผลผลิตต่อไร่เฉลี่ย 676 กิโลกรัมต่อไร่ สามารถแยกสถานการณ์การปลูกข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ แยกตามรายภาค ดังนี้

ภาคเหนือ ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์รุ่น 1 และ 2 มีเนื้อที่ปลูกเพิ่มขึ้น จากการปลูกแทนถั่วเหลือง เนื่องจากพันธุ์ถั่วเหลืองหายาก และมีราคาสูง ประกอบกับแรงงานเก็บเกี่ยวถั่วเหลืองหายาก เกษตรกรจึงเปลี่ยนมาปลูกข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ซึ่งให้ผลตอบแทนดีกว่า ในจังหวัดเชียงราย พะเยา ลำปาง ลำพูน ดาก แพร่ น่าน และพิษณุโลก ส่วนในจังหวัดสุโขทัยและเพชรบูรณ์ ลดเนื้อที่ไปปลูก อ้อยโรงงาน นอกจากนี้สวนยางพาราที่เคยปลูกข้าวโพดเลี้ยงสัตว์แซม ปัจจุบันต้นยางพาราโตไม่สามารถปลูกข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ได้อีก (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์)

ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เนื้อที่เพาะปลูกข้าวโพดเลี้ยงสัตว์รุ่น 1 ลดลง เกษตรกรปรับเปลี่ยนไปปลูกอ้อยโรงงาน มันสำปะหลัง นอกจากนี้สวนยางพาราที่เคยปลูกข้าวโพดเลี้ยงสัตว์แซม ปัจจุบันยางพาราโตไม่สามารถปลูกข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ได้อีก ในจังหวัดอุดรธานี หนองคาย ขอนแก่น และนครราชสีมา ยกเว้นในจังหวัดเลย หนองบัวลำภู และศรีสะเกษ เนื้อที่ปลูกเพิ่มแทนถั่วเหลือง เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ส่วนเนื้อที่เพาะปลูกข้าวโพดเลี้ยงสัตว์รุ่น 2 เพิ่มขึ้น จากการปลูกแทนถั่วเหลืองในจังหวัดเลยหนองบัวลำภู และขอนแก่น (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์)

ภาคกลาง เนื้อที่เพาะปลูกข้าวโพดเลี้ยงสัตว์รุ่น 1 ลดลง เกษตรกรปรับเปลี่ยนไปปลูกอ้อยโรงงาน และมันสำปะหลัง ซึ่งให้ผลตอบแทนดีกว่า ในจังหวัดสระบุรี และลพบุรี ส่วนในจังหวัดกาญจนบุรีและประจวบคีรีขันธ์ เพิ่มจากพื้นที่ปลูกสับปะรด เนื่องจากปีที่ผ่านมาสับปะรดราคาตกต่ำ (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.7 แสดงสถิติการปลูกข้าวโพดเลี้ยงสัตว์(ทั่วประเทศ): เนื้อที่เพาะปลูก เนื้อที่เก็บเกี่ยว ผลผลิต และผลผลิตต่อไร่ พ.ศ. 2550 – 2559

รายการ	2550	2551	2552	2553	2554	2555	2556	2557	2558	2559
เนื้อที่เพาะปลูก (พันไร่)	6,364	6,692	7,099	7,481	7,401	7,529	7,427	7,232	6,587	6,516
เนื้อที่เก็บเกี่ยว (พันไร่)	6,187	6,518	6,905	7,268	7,179	7,154	7,215	7,073	6,275	6,203
ผลผลิต (พันตัน)	3,890	4,249	4,616	4,861	4,973	4,948	4,876	4,730	4,029	4,058
ผลผลิตต่อไร่ (กิโลกรัม)	629	652	668	669	693	692	676	669	642	654

ที่มา : ดัดแปลงจากสำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

ตารางที่ 2.8 แสดงสถิติการปลูกข้าวโพดหวาน : เนื้อที่เพาะปลูก เนื้อที่เก็บเกี่ยว ผลผลิต และผลผลิตต่อเนื้อที่ปลูก ปี 2558 – 2560

พื้นที่	เนื้อที่เพาะปลูก (พันไร่)			เนื้อที่เก็บเกี่ยว (พันไร่)			ผลผลิต (พันตัน)			ผลผลิตต่อเนื้อที่ปลูก (กิโลกรัม)		
	2558	2559	2560	2558	2559	2560	2558	2559	2560	2558	2559	2560
ภาคเหนือ	94.844	115.604	118.174	93.307	114.739	117.078	204.971	272.490	291.343	2,161	2,357	2,465
ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ	40.344	39.818	40.107	39.428	39.364	39.522	75.302	76.620	78.441	1,866	1,924	1,956
ภาคกลาง	66.519	55.093	55.009	65.262	54.668	54.446	122.95	103.246	98.95	1,848	1,874	1,799
ภาคใต้	19.758	21.288	20.969	19.284	21.071	20.716	31.230	35.133	33.977	1,581	1,650	1,620

ที่มา : ดัดแปลงศูนย์สารสนเทศการเกษตร สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร

จากตารางที่ 2.8 และ ตารางที่ 2.9 วิเคราะห์ได้ว่าประเทศไทยมีอัตราการปลูกข้าวโพดในปริมาณที่สูง เมื่อมีการเก็บเกี่ยวและกระบวนการแปรรูป ก็ยังคงมีใบและลำต้นเป็นเศษเหลือใช้ทางการเกษตรอยู่จำนวนมาก ในส่วนของฝักหลังจากการแปรรูปก็จะมีเศษเหลือจำพวก เปลือก ฝัก ไหม และ ชัง ถึงแม้ว่าในปัจจุบันมีการศึกษาและการนำเปลือกข้าวโพดไปแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ เช่น กระดาษข้าวโพด เป็นผลผลิตอีกอย่างหนึ่งที่นำส่วนของเปลือกมาเข้ากระบวนการผลิตมาเป็นกระดาษที่สวยงาม การเพาะเห็ดถั่วหรือเห็ดโคนน้อย ทางภาคเหนือใช้เปลือกข้าวโพดมารวมๆกันแล้วหมักรดน้ำเพื่อให้เกิดเห็ดถั่วขึ้นมาได้ และดอกไม้จากเปลือกข้าวโพด ซึ่งการแปรรูปที่กล่าวมานั้น เป็นการนำวัสดุเหลือใช้ที่ได้จากธรรมชาติมาแปรรูปให้เกิดประโยชน์ อีกทั้งมีต้นทุนต่ำ และยังช่วยลดการเผาวัสดุเหลือใช้ทางธรรมชาติอีกด้วย

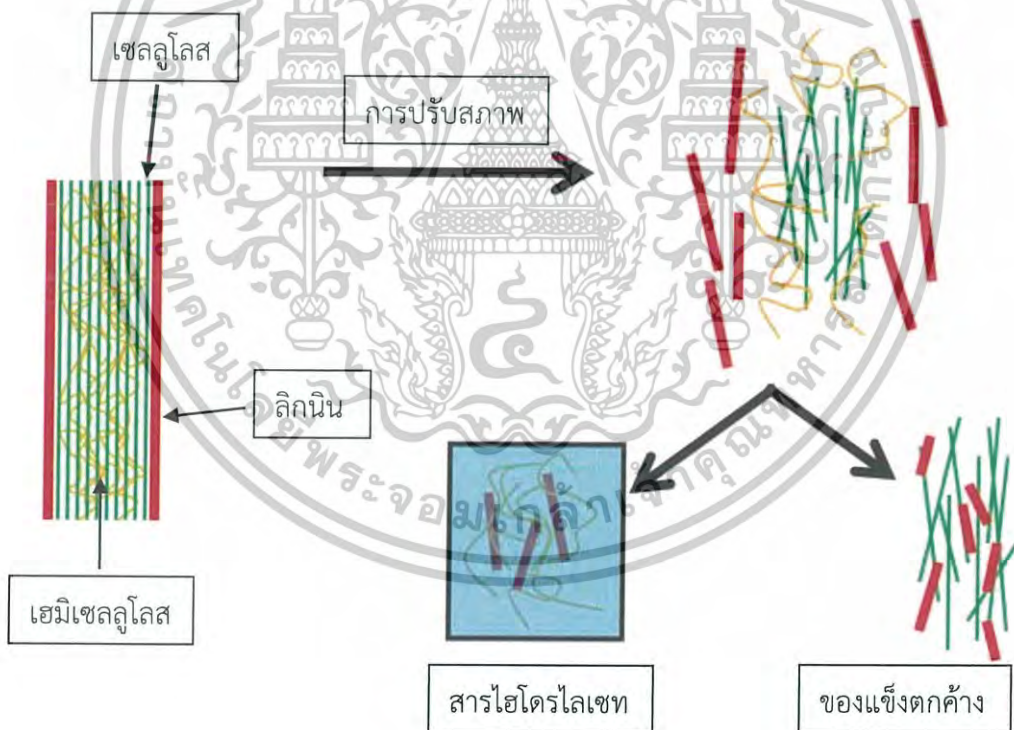


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.6 กระบวนการปรับสภาพ

การปรับสภาพวัตถุดิบมีวัตถุประสงค์เพื่อเป็นการกำจัดลิกนิน ดังรูปที่ 2.14 โดยลิกนินมีคุณสมบัติไปห่อหุ้มหรือเคลือบโครงสร้างของเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส ลิกนินจึงเป็นเหมือนผนังป้องกันไม่ให้จุลินทรีย์เข้าไปย่อยสลายเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส นอกจากนี้ยังมีวัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มขนาดรูพรุนของตัววัสดุลิกนินเซลลูโลสและลดการเกิดผลึกของเซลลูโลส (cellulose crystallinity) ทำให้เอนไซม์สามารถเข้าถึงวัตถุดิบได้ง่ายขึ้น (Sun และ Cheng, 2002) อีกทั้งยังช่วยลดค่าใช้จ่ายสำหรับใช้เอนไซม์ในการย่อยเซลลูโลสเนื่องจากหากใช้เอนไซม์ในการย่อยเพียงอย่างเดียวโดยไม่มีการปรับสภาพวัตถุดิบก่อนจะมีค่าใช้จ่ายสำหรับเอนไซม์ถึง ร้อยละ 25 ของต้นทุนการผลิตทั้งหมด (Brodeur และคณะ, 2011) กระบวนการปรับสภาพวัตถุดิบสามารถแบ่งออกเป็น 4 รูปแบบ ได้แก่

1. การปรับสภาพทางกายภาพ
2. การปรับสภาพทางกายภาพร่วมกับเคมี
3. การปรับสภาพทางเคมี
4. การปรับสภาพทางชีวภาพ



รูปที่ 2.14 การปรับสภาพวัตถุดิบที่แยกส่วนประกอบระหว่างของแข็งและของเหลว  
ที่มา : Sun และ Cheng (2002)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 2.6.1 การปรับสภาพโดยวิธีทางกายภาพ (physical pretreatment)

เป็นการใช้เครื่องมือหรือเครื่องจักรในการหั่น สับ และบด (mechanical comminution) เพื่อเพิ่มพื้นที่ผิวและลดขนาดอนุภาคของวัสดุลิกโนเซลลูโลส นอกจากนี้ยังเป็นการลดผลึกของเซลลูโลสด้วย โดยทั่วไปขนาดวัตถุบดหลังจากหั่นแล้วให้มีขนาดประมาณ 1-3 เซนติเมตร และมีขนาด 0.2-2 มิลลิเมตร หลังจากการบดละเอียดแล้ว พลังงานที่ต้องใช้ในการบดวัตถุบดขึ้นอยู่กับขนาดสุดท้ายของวัสดุลิกโนเซลลูโลสที่ต้องการ โดยส่วนใหญ่วิธีการปรับสภาพทางกายภาพจะใช้ร่วมกับกระบวนการปรับสภาพอื่น ๆ ด้วย (Harun และคณะ, 2011)

### 2.6.2 การปรับสภาพโดยวิธีทางกายภาพร่วมกับเคมี (physicochemical pretreatment)

เป็นกระบวนการปรับปรุงคุณภาพวัสดุลิกโนเซลลูโลสด้วยวิธีทางเชิงกลร่วมกับทางเคมี มีส่วนสำคัญในการละลายน้ำของเฮมิเซลลูโลสและลิกนินที่ถูกแปลงโครงสร้างแล้วเป็นผลทำให้การแตกตัวของเซลลูโลสในขั้นตอนไฮโดรไลซิสเพิ่มขึ้น เช่น วิธีการระเบิดด้วยไอน้ำ (steam explosion) การระเบิดด้วยแอมโมเนีย (ammonia fiber explosion) เป็นต้น (Hendriks และคณะ, 2009)

#### 2.6.2.1 การระเบิดด้วยไอน้ำ (steam explosion)

วัสดุลิกโนเซลลูโลสที่ผ่านการปรับสภาพด้วยวิธีทางกายภาพแล้วจะถูกปรับสภาพต่อด้วยไอน้ำ อิ่มตัวที่ความดันสูง หลังจากนั้นจึงลดความดันลง โดยส่วนใหญ่จะควบคุมอุณหภูมิที่ 160-260 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 0.69-4.83 เมกะพาสคาล (MPa) วัระยะหนึ่ง หลังจากนั้นจึงลดความดันลงให้เหลือเท่ากับความดันบรรยากาศ ซึ่งเป็นสาเหตุให้เกิดการย่อยสลายเฮมิเซลลูโลสและการเปลี่ยนรูปลิกนิน เนื่องจากอุณหภูมิสูงและเป็นการเพิ่มศักยภาพในการย่อยเซลลูโลสด้วย ปัจจัยที่มีผลต่อการระเบิดด้วยไอน้ำ ได้แก่ ระยะเวลา อุณหภูมิ และขนาดของชิ้นชีวมวล (Pejo และคณะ, 2008)

#### 2.6.2.2 การระเบิดด้วยแอมโมเนีย (ammonia fiber explosion, AFEX)

การทำให้วัสดุลิกโนเซลลูโลสสัมผัสกับแอมโมเนียเหลวที่อุณหภูมิและความดันสูงในระยะเวลาหนึ่ง หลังจากนั้นจึงลดความดันลง โดยมีตัวแปร 4 ตัวสำคัญ ในการปรับสภาพของกระบวนการนี้ให้มีประสิทธิผล ได้แก่ ปริมาณแอมโมเนีย ปริมาณน้ำ อุณหภูมิ และระยะเวลาในการทำปฏิกิริยา โดยทั่วไปกระบวนการ AFEX จะใช้แอมโมเนียเหลวปริมาณ 1-2 กิโลกรัมแอมโมเนียต่อ 1 กิโลกรัมวัสดุลิกโนเซลลูโลส ที่อุณหภูมิ 60-120 องศาเซลเซียส และความดัน 1.72-2.06 เมกะพาสคาล เป็นเวลา 30 นาที (Kumar และคณะ, 2009)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 2.6.3 การปรับสภาพโดยวิธีทางเคมี

เป็นกระบวนการปรับสภาพวัสดุลิกโนเซลลูโลสด้วยการใช้สารเคมี ถือเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพ และสามารถทำให้เกิดการสลายตัวของลิกนินและเฮมิเซลลูโลสในเส้นใยพืชได้ วิธีนี้มีจุดเด่นคือ เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดลิกนิน และสามารถทำได้ที่อุณหภูมิห้อง แต่ผลเสียของวิธีนี้ คือ มีค่าใช้จ่ายสูง (Sun and Cheng, 2002) สารเคมีที่นิยมใช้ อาทิ สารออกซิไดร์ (oxidizing agents) กรดต่างๆ และเกลือซึ่งสามารถย่อยสลายเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินได้ วิธีนี้สามารถทำภายใต้ ความดันและอุณหภูมิปกติได้ ต่างที่ใช้ได้แก่ ได้แก่ โซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide) แอมโมเนีย (ammonia) แอมโมเนียม ซัลไฟต์ (ammonium sulfite) กรดที่ใช้ได้แก่ กรดซัลฟูริก (sulphuric acid) กรดไฮโดรคลอริก (hydrochloric acid) กรดฟอสฟอริก (phosphoric acid) แก๊ส ที่ใช้ ได้แก่ คลอรีนไดออกไซด์ (chlorine dioxide) ไนโตรเจนไดออกไซด์ (nitrogen dioxide) ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ (sulphur dioxide) สารออกซิไดซ์เพิ่มเติม ได้แก่ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide) โอโซน (ozone) และสารทำละลายที่ใช้ ได้แก่ เอทานอล (ethanol) เบนซีน (benzene) เอทิลีน ไกลคอล (Ethylene glycol) บิวทานอล (butanol) และสารที่ทำให้เกิดการ พองบวม (swelling agents) เช่น การปรับสภาพด้วยโอโซน (ozonolysis) การปรับสภาพด้วยกรด (acid hydrolysis) การปรับสภาพด้วยด่าง (alkaline hydrolysis) การกำจัดลิกนินโดยวิธีการ ออกซิเดชัน (oxidative delignification) เป็นต้น (Sun และ Cheng , 2002)

#### 2.6.3.1 การปรับสภาพด้วยโอโซน (ozonolysis)

โอโซนสามารถย่อยสลายลิกนินและเฮมิเซลลูโลสในวัสดุชีวภาพลิกโนเซลลูโลสได้ เช่น ฟางข้าว สาเล่ ฆานอ้อย หญ้า พืชถั่ว ไม้สน โดยก๊าซโอโซนเป็นสารออกซิแดนท์ที่ดีที่สุดสามารถละลายน้ำได้ สามารถเข้าไปทำลายโครงสร้างของลิกนินและปล่อยสารประกอบที่ละลายน้ำได้และมีน้ำหนักโมเลกุล น้อย เช่น กรดอะซิติก กรดฟลอมิก (Balat และคณะ, 2011) ประสิทธิภาพการย่อยสลายลิกโน-เซลลูโลสด้วยเอนไซม์จะเพิ่มขึ้นเมื่อผ่านกระบวนการปรับสภาพด้วยโอโซน ข้อดีของการปรับสภาพ ด้วยวิธีนี้คือ (1) มีประสิทธิภาพในการกำจัดลิกนิน (2) ไม่ผลิตสารตกค้างที่เป็นพิษต่อกระบวนการ ต่อไป และ(3) ปฏิกริยาสามารถดำเนินได้ภายใต้สภาวะอุณหภูมิและความดันห้อง อย่างไรก็ตาม ต้องใช้โอโซนปริมาณมากในกระบวนการปรับสภาพทำให้มีค่าใช้จ่ายสูง (Cheng และคณะ, 2009) .

#### 2.6.3.2 การปรับสภาพด้วยกรด (acid hydrolysis)

กรดที่นิยมใช้ ได้แก่ กรดซัลฟูริก และกรดไฮโดรคลอริก ซึ่งเดิมเคยใช้กรดเข้มข้นในการย่อย ลิกโนเซลลูโลส แต่เนื่องจากกรดเข้มข้นเหล่านี้มีฤทธิ์กัดกร่อน มีความเป็นพิษและเป็นอันตรายต่อ สิ่งแวดล้อมจึงจำเป็นต้องใช้ถึงปฏิกริยาที่ทนทานต่อการกัดกร่อนและมีค่าใช้จ่ายในการคืนสภาพของ กรดนั้นสูงมาก ดังนั้นจึงใช้กรดเจือจางในการปรับสภาพและพบว่าเมื่ออัตราการเกิดปฏิกริยาสูงและ ไม่วากรณ์ใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งยังมีให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยเซลลูโลสได้ การปรับสภาพด้วยกรดเจือจางแบ่งเป็น 2 ชนิด คือ การใช้กรดเจือจางที่อุณหภูมิสูง (> 160 องศาเซลเซียส) และ การใช้กรดเจือจางที่อุณหภูมิต่ำ (< 160 องศาเซลเซียส) Jung และคณะ (2013) ได้ศึกษาการปรับสภาพหลายปาล์มเปลาต์ด้วยการใช้กรดเจือจาง พบว่าวิธีการนี้มีประสิทธิภาพมากโดยใช้กรดซัลฟูริก ร้อยละ 1 (น้ำหนักโดยปริมาตร) ทำปฏิกิริยาภายในเวลา 3 นาที ที่อุณหภูมิ 190 องศาเซลเซียส ถึงแม้ว่าการปรับสภาพด้วยกรดจะสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยเซลลูโลสได้ แต่ถ้าพิจารณาในเรื่องค่าใช้จ่ายพบว่ามีค่าใช้จ่ายที่สูงกว่าการปรับสภาพทางกายภาพร่วมกับเคมี นอกจากนี้จำเป็นต้องปรับพีเอชให้เป็นกลางก่อนหลังจากทำการปรับสภาพ เพื่อไม่ให้ขัดขวางการทำงานของกระบวนการในขั้นต่อไป

### 2.6.3.3 การปรับสภาพด้วยด่าง (alkaline hydrolysis)

โซเดียมไฮดรอกไซด์และปูนขาวเป็นสารเคมีที่นิยมใช้ในกระบวนการปรับสภาพด้วยด่าง ซึ่งต่างเหล่านี้สามารถแตกโครงสร้างของลิกนินและลดการเกิดผลึกของเซลลูโลส (Sun และ Cheng, 2002) การปรับสภาพด้วยด่างเป็นกระบวนการที่ง่ายและไม่ต้องใช้พลังงานมากเมื่อเปรียบเทียบกับ การปรับสภาพด้วยกรด Kim และคณะ (2008) ได้ศึกษาการปรับสภาพข้าวบาร์เลย์ด้วยแอมโมเนียพบว่า แอมโมเนียที่ความเข้มข้นร้อยละ 15 อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส เวลา 24-72 ชั่วโมง สามารถสกัดแยกเอาส่วนของลิกนินออกได้ถึงร้อยละ 50-66 นอกจากนี้ Chen และคณะ (2012) พบว่าร้อยละ 70 ของเอมิเซลลูโลสถูกกำจัดภายใน 4 สัปดาห์ ภายใต้การปรับสภาพด้วยด่างที่สภาวะอุณหภูมิห้อง และการใช้เอนไซม์ชนิดผสมหลังจากการปรับสภาพวัตถุดิบด้วยด่างแล้วสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายลิกโนเซลลูโลสได้อย่างมีนัยสำคัญ

### 2.6.3.4 การกำจัดลิกนินโดยวิธีการออกซิเดชัน (oxidative delignification)

การปรับสภาพด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ( $H_2O_2$ ) สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ในขั้นต่อไปได้ จากรายของ Oliva (2005) พบว่าปฏิกิริยาเฟนตัน [ปฏิกิริยาระหว่างเหล็ก (Fe) และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ( $H_2O_2$ ) เกิดเป็นไฮดรอกซิลเรดิคัล ( $OH^\bullet$ )] สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการหมักวัตถุดิบที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการระเบิดด้วยไอน้ำ เนื่องจากปฏิกิริยาเฟนตันสามารถย่อยสลายสารประกอบที่เป็นพิษที่เกิดขึ้นได้ เช่น ฟูแรน (furan) ฟีนอลิก (phenolic) นอกจากนี้ยังมีรายงานของ Jain และ Vigneshwaran (2012) ได้ศึกษาผลของการปรับสภาพเซลลูโลสด้วยสารละลายเฟนตัน พบว่าปฏิกิริยาเฟนตันที่เกิดขึ้นมีประสิทธิภาพในการปรับสภาพวัตถุดิบให้มีสภาพที่เอนไซม์สามารถเข้าถึงและย่อยสลายได้ดี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 2.6.4 การปรับสภาพโดยวิธีทางชีวภาพ

จุลินทรีย์สามารถใช้ในการปรับสภาพวัตถุติบประเภทลิกโนเซลลูโลสได้และยังเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในย่อยลิกโนเซลลูโลสด้วยเอนไซม์ แกรมยังย่อยลิกนิน รวมทั้งย่อยเฮมิเซลลูโลสด้วยส่วนเซลลูโลสถูกย่อยน้อยมากซึ่งเซลลูโลสมีความต้านทานในการถูกจุลินทรีย์ย่อยของจุลินทรีย์ได้มากกว่าส่วนอื่น ๆ ของลิกโนเซลลูโลส ปัจจุบันมีการใช้จุลินทรีย์ประเภท Brown-, White-, และ Soft-rot fungi ในการปรับสภาพลิกโนเซลลูโลส โดยจุลินทรีย์ประเภท White-rot fungi อาทิเช่น *Phanerochaete chrysosporium*, *Ceriporia lacerata*, *Cyathus stercoleris*, *Ceriporiopsis subvermisporo*, *Pycnoporus cinnabarinus* และ *Pleurotus ostreatus* เป็นจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการปรับสภาพด้วยกระบวนการทางชีวภาพ (Dashtban และคณะ, 2009)

อย่างไรก็ตามแต่ละกระบวนการปรับสภาพจะส่งผลต่อโครงสร้างของวัสดุประเภทลิกโน-เซลลูโลสแตกต่างกัน ดังนั้นการเลือกกระบวนการปรับสภาพมาใช้ในการปรับสภาพหรือเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลสนั้นจำเป็นต้องทราบถึงชนิด โครงสร้างทางเคมี และองค์ประกอบอื่น ๆ ของวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลสแต่ละชนิดเสียก่อน อีกทั้งศึกษาข้อดีและข้อเสียของกระบวนการปรับสภาพแต่ละวิธีดังตารางที่ 2.10 แล้วจึงทำการเลือกกระบวนการปรับสภาพให้เหมาะสม ทั้งนี้เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยเซลลูโลส นอกจากนี้ยังต้องคำนึงถึงค่าใช้จ่ายที่ใช้ในการดำเนินการและผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมอีกด้วย

ตารางที่ 2.9 ข้อดีและข้อเสียของการปรับสภาพวัสดุลิกโนเซลลูโลสโดยวิธีการต่าง ๆ

วิธีการปรับสภาพ	ข้อดี	ข้อเสีย
1. วิธีทางกายภาพ	เป็นการปรับสภาพเบื้องต้นโดยการลดขนาดวัตถุดิบเพื่อเพิ่มพื้นที่ผิวของวัตถุดิบ	ต้องใช้ร่วมกับกระบวนการปรับสภาพอื่น ๆ
2. วิธีทางกายภาพร่วมกับเคมี		
2.1 การระเบิดด้วยไอน้ำ	ใช้พลังงานต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับ การบดด้วยเครื่องจักรอย่างเดียว มีความคุ้มค่าเมื่อใช้ในการปรับสภาพไม้เนื้อแข็งและวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร	มีประสิทธิผลน้อยเมื่อใช้กับไม้เนื้ออ่อนทำลายส่วนประกอบของไซแลน (xylan) และก่อให้เกิดสารองค์ประกอบที่อาจไปขัดขวางการทำงานของจุลินทรีย์ที่ใช้ในกระบวนการต่อไป
2.2 การระเบิดด้วยแอมโมเนีย	ช่วยเพิ่มอัตราการเปลี่ยนแปลงเป็นน้ำตาล	มีประสิทธิผลน้อยเมื่อใช้ในการปรับสภาพชีวมวลที่มีองค์ประกอบของลิกนินสูง และมีค่าใช้จ่ายสูงกว่าการระเบิดด้วยไอน้ำ
3. วิธีทางเคมี		
3.1 การปรับสภาพด้วยโอโซน	มีประสิทธิภาพในการกำจัดลิกนิน ไม่ผลิตสารตกค้างที่เป็นพิษต่อกระบวนการต่อไป และปฏิกิริยาสามารถดำเนินได้ภายใต้สภาวะอุณหภูมิและความดันห้อง	ต้องใช้โอโซนปริมาณมากในกระบวนการปรับสภาพทำให้มีค่าใช้จ่ายสูง
3.2 การปรับสภาพด้วยกรด	สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยเซลลูโลสได้	มีค่าใช้จ่ายที่สูงกว่าการปรับสภาพทางกายภาพร่วมกับเคมี และจำเป็นต้องปรับพีเอช ให้เป็นกลางก่อนหลังจากปรับสภาพเพื่อไม่ให้ขัดขวางการทำงานของกระบวนการในขั้นต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่สามารถนำออกเผยแพร่ได้โดยไม่ได้รับอนุญาตจากเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีการปรับสภาพ	ข้อดี	ข้อเสีย
3.3 การปรับสภาพด้วยต่าง	เป็นกระบวนการที่ง่ายและไม่ต้องใช้พลังงานมากเมื่อเทียบกับการปรับสภาพด้วยกรด และสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายชีวมวล	จำเป็นต้องทำการปรับพีเอช ให้เป็นกลางก่อนหลังจากทำการปรับสภาพเพื่อไม่ให้ขัดขวางการทำงานของกระบวนการในขั้นต่อไป
3.4 การออกซิเดชัน	สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ในขั้นต่อไปได้ และปฏิกิริยาสามารถดำเนินได้ภายใต้สภาวะอุณหภูมิและความดันห้อง	สารเคมีที่ใช้มีราคาสูง เช่น $H_2O_2$
4. วิธีทางชีวภาพ	ใช้พลังงานน้อย ไม่ใช้สารเคมีในกระบวนการทำให้เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม	อัตราการย่อยสลายที่เกิดขึ้นค่อนข้างต่ำทำให้ต้องใช้เวลานานในการย่อยสลายและใช้พื้นที่ในการผลิตมาก

ที่มา : ดัดแปลงจาก Shady และคณะ (2018)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.7 กระบวนการแยกกรดมาลิกให้บริสุทธิ์

กระบวนการแยกกรดมาลิกเป็นกระบวนการที่แยกกรดมาลิกออกจากผลิตภัณฑ์ทั้งหมดที่อยู่ในน้ำหมัก ซึ่งจะประกอบด้วย การแยกตะกอนต่างๆออกจากน้ำหมักด้วยวิธีการกรองหรือการปั่นเหวี่ยง โดยในขั้นตอนนี้จะได้ส่วนน้ำหมักออกมา แล้วทำการแยกส่วนที่เป็นกรดมาลิกออกมา ซึ่งมีวิธีต่างๆดังนี้

การทำให้ตกผลึก (Direct crystallization) สามารถทำได้โดยนำกรดอินทรีย์ไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และนำไปกลั่นโดยการลดความดัน เพื่อกำจัดสารอื่นๆที่ไม่ต้องการ จากนั้นนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อให้มีผลึกของกรดอินทรีย์เกิดขึ้น (Cheng และคณะ, 2012)

การตกตะกอน (Precipitation) เป็นวิธีการดั้งเดิมที่ใช้แยกกรดอินทรีย์ออกจากน้ำหมัก โดยการเติมแคลเซียมไฮดรอกไซด์ ( $\text{CaOH}_2$ ) หรือแคลเซียมออกไซด์ ( $\text{CaO}$ ) เพื่อให้เกิดตะกอนของเกลือ หลังจากนั้นจึงนำตะกอนไปกรองด้วยกระดาษกรอง แล้วแยกเอากรดอินทรีย์ออกมาไปทำให้บริสุทธิ์ต่อไป (Cheng และคณะ, 2012)

การแยกด้วยเมมเบรน (Membrane separation) เมมเบรนที่นิยมนำมาใช้กรอง มีทั้งแบบ microfiltration, ultrafiltration และ nanofiltration หรืออาจใช้วิธีการแยกด้วยกระบวนการแยกไฟฟ้าเมมเบรน (electrodialysis) (Cheng และคณะ, 2012)

การสกัดด้วยตัวทำละลายเคมี (Solvent extraction) ที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายคือการสกัดของเหลวด้วยของเหลว โดยตัวทำละลายที่ใช้มีหลายชนิด ได้แก่ อะลิฟาติกไฮโดรคาร์บอน (aliphatic hydrocarbons), อะลิฟาติกแอลกอฮอล์ (aliphatic alcohols), คีโตน (ketones) และ ออร์กาโนฟอสเฟต (organophosphates) แต่วิธีการนี้มีข้อเสียคือไม่สามารถเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์หลักออกมาได้อย่างสมบูรณ์ (Cheng และคณะ, 2012)

## 2.8 ประโยชน์ของกรตมาลิก

เนื่องจากกรตมาลิกสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้อย่างหลากหลาย ในปัจจุบันจึงได้เกิดความต้องการในการนำกรตมาลิกมาใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆมากขึ้น เช่นอุตสาหกรรมยา เครื่องสำอาง อาหาร และโลหะ เป็นต้น

### 2.8.1 อุตสาหกรรมเครื่องสำอางและการแพทย์

กรตมาลิกถูกนำไปใช้งานในด้านอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง เนื่องจากทำให้เกิดกลิ่นหอม หรือเป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์ครีมลวีร์รอย ส่วนในด้านอุตสาหกรรมยา กรตมาลิกมีส่วนช่วยรักษาความผิดปกติของตับและอาการ hyperammonemia ซึ่งเกิดจากความผิดปกติของวัฏจักรยูเรียภายในร่างกายที่ส่งผลให้มีระดับของแอมโมเนียในเลือดสูง ผู้ป่วยมักจะปรากฏอาการตั้งแต่ในช่วงวัยทารก แรกคลอด ทำให้มีอาการซึม ไม่อยากอาหาร อาเจียน ชักและหมดสติ จึงได้นำกรตมาลิกไปเป็นส่วนประกอบของกรดอะมิโนที่นำไปฉีดเข้าสู่เส้นเลือดให้กับผู้ป่วย (Hronska และคณะ, 2015) นอกจากนี้พอลิเมอร์ของกรตมาลิกยังถูกนำไปใช้งานในระบบการนำส่งยาเพื่อสามารถนำยาไปยังอวัยวะหรือบริเวณเป้าหมายในร่างกายได้ตามต้องการ ทำให้เกิดผลสูงสุดในการรักษาและลดผลข้างเคียง เนื่องจากมีลักษณะที่ละลายน้ำได้ สามารถย่อยสลายได้ในร่างกายและมีความเข้ากันได้กับเนื้อเยื่อภายในร่างกาย (Iyyappan และคณะ, 2018)

### 2.8.2 อุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม

กรตมาลิกถูกนำมาใช้กันอย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม (Goldberg และคณะ, 2006) ซึ่งกรตมาลิกนั้นจะให้รสชาติเปรี้ยวน้อยกว่ากรดกรดซิตริก เมื่อทานแล้วหรือทานผสมกับกรดซิตริกจะให้รสชาติที่กลมกล่อม โดยกรตมาลิกมักจะถูกนำมาใช้เป็นสารเติมแต่งในอาหารขนม และเครื่องดื่มเพื่อให้มีกลิ่นและรสชาติที่ดี นอกจากนี้ยังนำกรตมาลิกมาใช้ร่วมกับสารให้ความหวานเทียมเช่น แซ็กคาริน และ แอสพาแทม เป็นต้น (Archer และ คณะ, 2008)

### 2.8.3 อุตสาหกรรมทางด้านโลหะ

กรตมาลิกถูกนำมาใช้เป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์สารทำความสะอาดโลหะ และยังสามารถใช้ในอุตสาหกรรมการชุบโลหะแบบไม่ใช้ไฟฟ้า (Electroless plating) ซึ่งเป็นกระบวนการจับตัวของโลหะที่ผิวหน้าวัตถุ ที่เกิดจากปฏิกิริยาทางเคมีโดยไม่ใช้กระแสไฟฟ้า ตัวอย่างเช่น การชุบทองแดง และ นิกเกิล แบบไม่ใช้กระแสไฟฟ้าลงบนแผ่นวงจรพิมพ์ ช่วยเพิ่มความมันวาวให้กับผิวของโลหะ (Goldberg และคณะ, 2006)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 2.8.4 การนำไปใช้เป็นสารคีเลต (chelation agent)

สารคีเลตที่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารส่วนใหญ่เป็นสารที่ได้จากกรดซิตริก กรดมาลิก กรดทาร์ทาริก กรดออกซาลิก และกรดซัคซินิก โดยสารคีเลตจะเป็นสารที่ช่วยจับไอออนของโลหะ มีบทบาทสำคัญในด้านอาหารคือ การทำปฏิกิริยากับโลหะและไอออนของโลหะอัลคาไลน์เอิร์ทที่ปะปนอยู่ในอาหารให้เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อน โดยวิธีนี้จะทำให้โลหะหรือไอออนที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาต่างๆ ที่ทำให้อาหารเสื่อมคุณภาพลดน้อยลง เช่น ช่วยรักษาเสถียรภาพของสี กลิ่น รส และเนื้อสัมผัสของอาหาร โลหะหลายตัวที่อยู่ในสภาวะคีเลต (chelated state) ในธรรมชาติ เช่น แมกนีเซียมในคลอโรฟิลล์ ทองแดง และสังกะสี เมื่อโลหะไอออนเหล่านี้ถูกปลดปล่อยออกมาโดยปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสหรือปฏิกิริยาการแตกหัก (degradation reactions) จะสามารถทำให้เกิดปฏิกิริยาต่างๆ ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนสี เกิดกลิ่นหืน ความขุ่น และการเปลี่ยนแปลงกลิ่นรสของอาหาร จึงได้มีการนำสารคีเลตมาใช้เพื่อให้เกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับโลหะไอออนเหล่านี้และช่วยให้อาหารคงคุณภาพไว้ได้ เช่น การใช้สารคีเลตเพื่อช่วยทำให้น้ำมันและไขมันคงตัว การใช้สารคีเลตในอาหารทะเลเพื่อป้องกันการเปลี่ยนสีของอาหาร การใช้สารคีเลตในเครื่องดื่มเพื่อป้องกันความขุ่นที่จะเกิดขึ้น และการใช้สาร คีเลตเพื่อช่วยรักษาเสถียรภาพของวิตามินในอาหาร (Hronska และคณะ, 2015)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 3

### วิธีดำเนินงานวิจัย

#### 3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

3.1.1 กระจกบอทดวง

3.1.2 กระจกบอกร้ากลั่น

3.1.3 ขวดบรรจุอาหาร (Duran)

3.1.4 ขวดรูปชมพู ขนาด 125 มิลลิลิตร

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

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

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

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

3.1.9 เครื่องผสมสารละลาย (Vortex Mixer) ยี่ห้อ VELP Scientific ประเทศอิตาลี

3.1.10 เครื่องวัดความเป็นกรดเบส (pH meter) ยี่ห้อ Mortek รุ่น PH500 ประเทศสหรัฐอเมริกา

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

3.1.12 จานเพาะเลี้ยงเชื้อ (Plate)

3.1.13 ชุดขวดและแคลมป์จับ

3.1.14 ซ้อนตักสาร

3.1.15 ตะเกียงแอลกอฮอล์

3.1.16 ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) ยี่ห้อ Contherm รุ่น Polar 1000 ประเทศนิวซีแลนด์

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

3.1.18 ตู้อบลมร้อน (Hot air oven) ยี่ห้อ Shel Lab รุ่น 1375 FX forced air oven ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.1.19 โถดูดความชื้น (desiccator)

3.1.20 ที่วางหลอดทดลอง (Rack) และหลอดทดลอง

3.1.21 แท่งแก้วคนสาร

3.1.22 บิวเรต

3.1.23 ปีกเกอร์

3.1.24 ปิดเปิด

3.1.25 ลูกยางดูดสาร

3.1.26 ลวดเขี่ยเชื้อ (loop)

3.1.27 อ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) รุ่น WNB7 ฝา Slope ยี่ห้อ MEMMERT ประเทศเยอรมนี

## 3.2 สารเคมี

3.2.1 Accellerase 1500 ยี่ห้อ Dupont ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.2.2 Agar ยี่ห้อ Himedia ประเทศอินเดีย

3.2.3 Alcohol 70%

3.2.4 Alcohol 95%

3.2.5 Bovine Serum Albumin (BSA) ยี่ห้อ Sigma ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.2.6 Calcium carbonate ( $\text{CaCO}_3$ ) ยี่ห้อ Univar reagent ประเทศออสเตรเลีย

3.2.7 Carboxy methyl cellulose (CMC) ยี่ห้อ Sigma ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.2.8 Citric acid ยี่ห้อ Univar reagent ประเทศนิวซีแลนด์

3.2.9 Conc. Sulfuric acid ( $\text{H}_2\text{SO}_4$  95-97%) ยี่ห้อ Univar reagent ประเทศออสเตรเลีย

3.2.10 Corn steep liquor ยี่ห้อ Sigma ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.2.11 Copper sulfate ( $\text{CuSO}_4$ ) ยี่ห้อ CARLO ERBA Reagent ประเทศอิตาลี

3.2.12 3,5-Dinitrosalicylic acid (DNS) ยี่ห้อ Sigma-ALDRICH ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.2.13 Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) ยี่ห้อ Univar reagent ประเทศออสเตรเลีย

3.2.14 Folin-ciocalteu reagent ยี่ห้อ Fluka Chemika ประเทศสวิสเซอร์แลนด์

3.2.15 Glucose ( $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_6$ ) ยี่ห้อ Huakang ประเทศจีน

3.2.16 Glycerol ยี่ห้อ Fisher chemical ประเทศอังกฤษ

3.2.17 Hydrochloric acid (HCl 37%) ยี่ห้อ loba chemie ประเทศอินเดีย

3.2.18 Hydroxy naphthol blue ยี่ห้อ loba chemie ประเทศอินเดีย

3.2.19 Magnesium sulfate heptahydrate ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) ยี่ห้อ Fluka Chemika ประเทศสวิสเซอร์แลนด์

3.2.20 Manganese (II) sulphate ( $\text{MgSO}_4$ ) ยี่ห้อ Univar reagent ประเทศออสเตรเลีย

3.2.21 Methanol ยี่ห้อ Honey well ประเทศเกาหลี

3.2.22 Potassium chloride (KCl) ยี่ห้อ Univar reagent ประเทศนิวซีแลนด์

3.2.23 Potassium dihydrogen phosphate ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) ยี่ห้อ CARLO ERBA Reagent ประเทศอิตาลี

3.2.24 Potassium sodium (+) – Tartrate ( $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) ยี่ห้อ Univar reagent ประเทศออสเตรเลีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 3.2.25 Sodium carbonate ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) ยี่ห้อ Univar reagent ประเทศออสเตรเลีย
- 3.2.26 Sodium hydroxide ( $\text{NaOH}$ ) ยี่ห้อ Univar reagent ประเทศออสเตรเลีย
- 3.2.27 Trisodium citrate dehydrate ( $\text{C}_6\text{H}_9\text{Na}_3\text{O}_9$ ) ยี่ห้อ Univar reagent ประเทศออสเตรเลีย
- 3.2.28 Xylose ( $\text{C}_5\text{H}_{10}\text{O}_5$ ) ยี่ห้อ Huakang ประเทศจีน
- 3.2.29 Yeast extract ยี่ห้อ Scharlau Microbiology ประเทศอังกฤษ



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.3 ขั้นตอนการดำเนินงาน

#### 3.3.1 แบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษา

แบคทีเรียไอโซเลต FX1 ซึ่งคัดแยกได้จากบ่อบำบัดน้ำเสีย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง สามารถผลิตกรดมาลิกได้ โดยใช้น้ำตาลไซโลส 100 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน ดังนั้น จึงเลือกแบคทีเรียไอโซเลต FX1 นี้สำหรับศึกษาในครั้งนี้ (ประภัสสร เทพกัญท์ และสุพรรณิกา ยอดสง่า, 2557)

#### 3.3.2 การเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรียเริ่มต้น

ทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียไอโซเลต FX1 ที่สามารถผลิตมาลิกได้ในอาหารเหลว Selective medium ซึ่งประกอบด้วย Xylose ร้อยละ 10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร Yeast extract ร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ร้อยละ 0.1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ร้อยละ 0.05 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และ  $\text{CaCO}_3$  ร้อยละ 1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (Tabushi และคณะ, 1981) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่สภาวะเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที สังเกตการเปลี่ยนแปลงจนกระทั่งแคลเซียมคาร์บอเนตลดลงหรือหมดไป (ประมาณ 2 วัน) จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร และปรับให้หัวเชื้อเริ่มต้นมีค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 0.7-0.9 เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อเริ่มต้นสำหรับการเพาะเลี้ยงต่อไป

#### 3.3.3 การปรับสภาพเปลือกข้าวโพดด้วยด่างโซเดียมไฮดรอกไซด์

นำเปลือกข้าวโพด 5 กรัม มาเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.05, 0.1, 0.25 และ 1 โมลาร์ ตามลำดับ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และนำไปเข้าเครื่องนึ่งความดันไอ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นของเหลวที่ได้นำไปวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ส่วนเปลือกข้าวโพดที่เหลือนำไปล้างด้วยน้ำประปาโดยการกรองผ่านผ้าขาวบางจนกระทั่งมีพีเอชเป็นกลาง แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสจนแห้ง จากนั้นนำมาชั่งน้ำหนักและเก็บไว้สำหรับใช้ในการย่อยด้วยเอนไซม์ต่อไป (Rama และคณะ, 2014)

#### 3.3.4 การศึกษาผลของการใช้เอนไซม์เซลลูเลสทางการค้าย่อยสลายเปลือกข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพแล้ว

ทำการย่อยเปลือกข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพแล้วด้วยเอนไซม์ในหลอดฝาเกลียว โดยใช้ Accellerase 1500 ใช้ในปริมาณ 48.05 ยูนิตต่อเปลือกข้าวโพดที่ใช้เป็นซับสเตรท 0.5 กรัม และ จีเตรตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ค่าพีเอชเท่ากับ  $4.8 \pm 0.02$  ปริมาตร 9 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปต้มเป็นเวลา 10 นาที เพื่อหยุดการทำงานของเอนไซม์ แล้วจึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อใช้ในการศึกษาเท่านั้น เมื่อผู้ยืมได้เห็นเอกสารฉบับนี้แล้ว กรุณา  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เพื่อกำจัดส่วนที่เป็นของแข็ง ส่วนใสที่ได้จะถูกนำไปวัดน้ำตาลรีดิวซ์ และถูกใช้เป็นสารไฮโดรไลเซทเพื่อนำไปผลิตกรดมาลิกต่อไป (Yang และคณะ, 2016)

### 3.3.5 การศึกษาการใช้สารไฮโดรไลเซทเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตกรดมาลิกในพลาสก์โดยแบคทีเรียไอโซเลต FX1

#### 3.3.5.1 การศึกษาการผลิตกรดมาลิกโดยใช้สารไฮโดรไลเซทเป็นแหล่งคาร์บอน

ทำการหมักแบคทีเรียไอโซเลต FX1 โดยนำหัวเชื้อจากข้อ 3.3.2 ร้อยละ 10 โดยปริมาตรเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร calcium malate production (Khan และคณะ, 2014) ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ในพลาสก์ขนาด 125 มิลลิลิตร โดยใช้สารไฮโดรไลเซทที่ผ่านการต้มระเหยให้มีความเข้มข้นของน้ำตาล เท่ากับ 120 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน นำไปเพาะเลี้ยงที่สภาวะเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ และเก็บตัวอย่างทุกๆ 2 วัน เป็นระยะเวลา 6 วัน ปริมาตร 1 มิลลิลิตรต่อพลาสก์ และนำตัวอย่างที่ได้ ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 9000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกส่วนที่เป็นตะกอนเซลล์และแคลเซียมคาร์บอเนตออก หลังจากนั้นนำส่วนใสไปวิเคราะห์หาปริมาณแคลเซียมมาเลตด้วยวิธีการไทเทรต ตรวจสอบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS และตรวจสอบพีเอชด้วยเครื่องวัดพีเอช (pH meter)

#### 3.3.5.2 การศึกษาการผลิตกรดมาลิกโดยการใช้สารไฮโดรไลเซทร่วมกับน้ำตาลกลูโคสหรือไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอน

ทำการหมักแบคทีเรียไอโซเลต FX1 โดยนำหัวเชื้อจากข้อ 3.3.2 ร้อยละ 10 โดยปริมาตรเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร calcium malate production (Khan และคณะ, 2014) ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ในพลาสก์ขนาด 125 มิลลิลิตร โดยการเลือกใช้สารไฮโดรไลเซทที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดเป็นแหล่งคาร์บอน และปรับให้น้ำตาลรีดิวซ์มีความเข้มข้นเท่ากับ 120 กรัมต่อลิตรโดยการเติมน้ำตาลกลูโคสหรือไซโลสผสมลงไป นำไปเพาะเลี้ยงที่สภาวะเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ และเก็บตัวอย่างเป็นเวลา 6 วัน ปริมาตร 1 มิลลิลิตรต่อพลาสก์ และนำตัวอย่างที่ได้ ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 9000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกส่วนที่เป็นตะกอนเซลล์และแคลเซียมคาร์บอเนตออก หลังจากนั้นนำส่วนใสไปวิเคราะห์หาปริมาณแคลเซียมมาเลตด้วยวิธีการไทเทรต ตรวจสอบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS และตรวจสอบพีเอชด้วยเครื่องวัดพีเอช (pH meter) เพื่อศึกษาสารไฮโดรไลเซทที่ผ่านการผสมน้ำตาลกลูโคสหรือไซโลสชนิดที่ให้ปริมาณกรดมาลิกที่อยู่ในรูปแคลเซียมมาเลตสูงสุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.3.5.3 การศึกษาผลของปริมาณแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดมาลิกโดยแบคทีเรียไอโซเลต FX1

เมื่อทราบความเข้มข้นของสารไฮโดรไลเซทที่ผ่านการผสมน้ำตาลกลูโคสหรือไซโลสที่เหมาะสมแล้ว จึงทำการปรับเปลี่ยนปริมาณแหล่งไนโตรเจน ในอาหารสูตร calcium malate production (Khan และคณะ, 2014) ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 125 มิลลิลิตร โดยใช้ corn steep liquor เป็นแหล่งไนโตรเจนความเข้มข้นร้อยละ 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 และ 0.6 จากนั้นทำการหมักแบคทีเรียไอโซเลต FX1 โดยนำหัวเชื้อจากข้อ 3.3.2 ร้อยละ 10 โดยปริมาตรเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร calcium malate production (Khan และคณะ, 2014) ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 125 ที่ผ่านการปรับเปลี่ยนแหล่งไนโตรเจน จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงที่สภาวะเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทำการทดลองทั้งหมด 3 ชั่วโมง และเก็บตัวอย่างเป็นเวลา 6 วัน ปริมาตร 1 มิลลิลิตรต่อฟลาสก์ และนำตัวอย่างที่ได้ ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 9000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกส่วนที่เป็นตะกอนเซลล์และแคลเซียมคาร์บอเนตออก หลังจากนั้นนำส่วนใสไปวิเคราะห์หาปริมาณแคลเซียมมาเลตด้วยวิธีการไทเทรต ตรวจสอบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS และตรวจสอบพีเอชด้วยเครื่องวัดพีเอช (pH meter) เพื่อศึกษาสารไฮโดรไลเซทที่ผ่านการผสมน้ำตาลกลูโคสหรือไซโลสชนิดที่ให้ปริมาณกรดมาลิกที่ อยู่ในรูปแคลเซียมมาเลตสูงที่สุด

### 3.3.6 การเก็บตัวอย่างเพื่อนำไปวิเคราะห์

เก็บตัวอย่างน้ำหมักปริมาตร 1 มิลลิลิตรต่อฟลาสก์ โดยการทดลองการผลิตกรดมาลิกโดยใช้สารไฮโดรไลเซทเป็นแหล่งคาร์บอนและการทดลองผลของปริมาณแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดมาลิกโดยแบคทีเรียไอโซเลต FX1 เก็บตัวอย่างทุกๆ 2 วัน และการทดลองการผลิตกรดมาลิกโดยการใช้สารไฮโดรไลเซทร่วมกับน้ำตาลกลูโคสหรือไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอนเก็บตัวอย่างในวันที่ 0 และวันที่ 6 จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 9000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกเอาส่วนที่เป็นตะกอนเซลล์และแคลเซียมคาร์บอเนตออก นำส่วนใสที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณแคลเซียมมาเลต ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และตรวจสอบค่าพีเอชด้วยเครื่องวัดพีเอช

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.3.7 การวิเคราะห์ปริมาณแคลเซียมมาเลต

#### 3.3.7.1 การตกตะกอนแคลเซียมมาเลตด้วยเมทานอล

นำน้ำหมักปริมาตร 25 มิลลิลิตร ไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 7000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เพื่อตกตะกอนเซลล์และแคลเซียมคาร์บอเนตที่ยังเหลืออยู่ออกไป แล้วนำส่วนใสเติมเมทานอลปริมาตร 15 มิลลิลิตร เพื่อกำจัดเอ็กโซโพลีแซ็กคาไรด์ และนำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งด้วยความเร็วรอบ 7000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำส่วนใสที่ได้เติมเมทานอลปริมาตร 30 มิลลิลิตรเพื่อตกตะกอนแคลเซียมมาเลต นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ข้ามคืน แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 7000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และนำตะกอนที่ได้อบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส จนกว่าตะกอนจะแห้ง จากนั้นนำตะกอนที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณแคลเซียมมาเลตด้วยวิธีการไทเทรต (Wang และคณะ, 2013)

#### 3.3.7.2 การหาปริมาณแคลเซียมมาเลตด้วยวิธีการไทเทรต

นำตะกอนที่ผ่านการอบแล้วปริมาตร 0.2 กรัม เติมนลงในสารผสมระหว่างน้ำกลั่นปริมาตร 10 มิลลิลิตร และกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 3.1 โมลาร์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เติมนสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1.075 โมลาร์ ปริมาตร 15 มิลลิลิตร และเติมไฮโดรฟีนอลบลู ประมาณ 3-4 หยด เป็นอินดิเคเตอร์ แล้วนำไปไทเทรตด้วยสารละลาย Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ จนกระทั่งถึงจุดยุติ นำปริมาตร EDTA ที่ใช้ในการไทเทรตมาคำนวณหาปริมาณของแคลเซียมมาเลต (FAO, 2006)

### 3.3.8 การตรวจสอบหาปริมาณน้ำตาล

#### 3.3.8.1 การตรวจสอบหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS

ทำการเจือจางสารละลายตัวอย่าง ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร แล้วนำไปเติมน้ำกลั่น ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที เมื่อครบเวลาจึงนำมาทำให้เย็น แล้วเติมน้ำกลั่นปริมาตร 3 มิลลิลิตร ลงไป ผสมให้เข้ากัน และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร โดยใช้กลูโคสเป็นสารละลายมาตรฐาน (Miller, 1959)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.3.9 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ CMCase

ทำการเจือจางสารละลายเอนไซม์ CMCase ด้วยซีเตรตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอชเท่ากับ  $4.8 \pm 0.02$  จากนั้นดูดสารละลายที่เจือจางแล้วมา 0.5 มิลลิลิตร (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ) แล้วเติมสารละลาย CMC ความเข้มข้นร้อยละ 1 น้ำหนักโดยปริมาตรละลายในซีเตรตบัฟเฟอร์ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติมสารละลาย DNS 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที เมื่อครบเวลาจึงนำมาทำให้เย็น แล้วเติมน้ำกลั่นปริมาตร 6 มิลลิลิตรลงไป ผสมให้เข้ากันและนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร โดยใช้กลูโคสเป็นสารละลายมาตรฐาน สำหรับชุดควบคุม ดูดสารละลายเอนไซม์ที่เจือจางแล้วมา 0.5 มิลลิลิตร (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ) นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาทีเพื่อเป็นการหยุดการทำงานของเอนไซม์ หลังจากนั้นเติมสารละลาย CMC ความเข้มข้นร้อยละ 1 น้ำหนักโดยปริมาตรละลายในซีเตรตบัฟเฟอร์ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เติมสารละลาย DNS 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที เมื่อครบเวลาจึงนำมาทำให้เย็น แล้วเติมน้ำกลั่นปริมาตร 6 มิลลิลิตรลงไป ผสมให้เข้ากันและนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร โดยใช้กลูโคสเป็นสารละลายมาตรฐาน

\*หมายเหตุ 1 ยูนิตต่อนาที หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายซัพสเตรทให้ได้ น้ำตาลกลูโคส 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที ที่สภาวะทดสอบ

### 3.3.10 การหาปริมาณโปรตีนสารละลายเอนไซม์

นำสารละลายเอนไซม์ Accellerase 1500 มาทำการเจือจาง ดูดตัวอย่างมาอย่างละ 1 มิลลิลิตร เติมสารละลาย ค. (สารละลายอัลคาไลน์คอปเปอร์) 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นเติมสารละลาย Folin-ciocalter ความเข้มข้น 1 โมลาร์ 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร โดยใช้ Bovine Serum Albumin (BSA) เป็นสารละลายมาตรฐาน

## บทที่ 4

### ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

จากการศึกษาของ ประภัสสร เทพกัณฑ์ และสุพรรณิภา ยอดสง่า (2557) พบว่าแบคทีเรียชนิดไอโซเลต FX1 ซึ่งคัดแยกได้จากบ่อบำบัดน้ำเสียสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง สามารถผลิตกรดมาลิกได้ 34.03 กรัมต่อลิตร โดยใช้ไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร และจากการศึกษาของชญาณี มูลมงคลและคณะ (2559) ได้ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมบางประการต่อการผลิตกรดมาลิก โดยแบคทีเรียไอโซเลต FX1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร Calcium malate production (Khan และคณะ, 2014) สามารถผลิตแคลเซียมมาเลตได้สูงสุด  $50.84 \pm 0.71$  กรัมต่อลิตร จึงเลือกใช้แบคทีเรียไอโซเลต FX1 และอาหารเหลวสูตร Calcium malate production สำหรับในการศึกษาครั้งนี้ ประกอบด้วยประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรมจึงทำให้มีวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรเป็นจำนวนมาก ดังนั้นโครงการพิเศษนี้จึงได้มีการพยายามที่จะศึกษาการผลิตกรดมาลิกโดยใช้แบคทีเรียไอโซเลต FX1 โดยการใช้สารไฮโดรไลเซทจากเปลือกข้าวโพดซึ่งเป็นวัสดุลิกโนเซลลูโลสมาเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อนำไปใช้เป็นแนวทางในการผลิตกรดมาลิกจากวัตถุดิบที่มีราคาถูกต่อไป

#### 4.1 การศึกษาผลของการใช้เอนไซม์เซลลูเลสทางการค้าย่อยสลายเปลือกข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพด้วยด่างโซเดียมไฮดรอกไซด์

##### 4.1.1 ผลของการปรับสภาพเปลือกข้าวโพดด้วยด่างโซเดียมไฮดรอกไซด์

การปรับสภาพเปลือกข้าวโพดด้วยวิธีทางเคมีนั้นสามารถทำได้หลายวิธี โดยการศึกษาในครั้งนี้เลือกใช้วิธีกระบวนการปรับสภาพด้วยด่าง ซึ่งจากการศึกษาของ Chi และคณะ (2016) รายงานว่าการปรับสภาพด้วยด่างสามารถทำลายโครงสร้างของลิกนินและลดการเกิดผลึกเซลลูโลส และเกิดองค์ประกอบอื่นๆของสารที่เป็นพิษต่อเซลล์ได้น้อยกว่าเมื่อเทียบกับการปรับสภาพด้วยกรด (Alvira และคณะ, 2010) และการปรับสภาพด้วยด่างเป็นกระบวนการที่ง่ายและไม่ต้องใช้พลังงานมากเมื่อเปรียบเทียบกับกระบวนการปรับสภาพด้วยกรด และสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายชีวมวล แต่ยังมีข้อจำกัด คือ จำเป็นต้องทำการปรับค่าพีเอชของวัสดุลิกโนเซลลูโลสให้เป็นกลางก่อนเพื่อไม่ให้เกิดขบวนการทำงานของกระบวนการในขั้นตอนการย่อยด้วยเอนไซม์ต่อไป โดยองค์ประกอบของเปลือกข้าวโพดนั้นมีปริมาณของลิกนินอยู่ในช่วงประมาณร้อยละ 32-35 ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของเปลือกข้าวโพด (Barl และคณะ, 1991) และจากการศึกษาของ Zhu และคณะ (2006) รายงานว่าการปรับสภาพลิกโนเซลลูโลสด้วยด่างเป็นวิธีที่นิยมใช้ในการแยก (fractionation) ลิกนินและเฮมิเซลลูโลสออกจากเซลลูโลส เพราะวิธีนี้สามารถใช้อุณหภูมิ ความดัน และเวลาในการปรับสภาพต่ำกว่าวิธีอื่นๆ การปรับสภาพด้วยด่างทำให้ลิกโนเซลลูโลสแยกออกเป็น 2 ส่วนคือ ของแข็งและ

ของเหลว ส่วนที่เป็นของแข็งประกอบด้วยเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบหลัก และอื่นๆ ส่วนที่เป็นของเหลวประกอบด้วยลิกนิน เฮมิเซลลูโลส และอื่นๆ ทั้งนี้ส่วนของแข็งจะถูกนำไปผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ โดยการย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเอนไซม์ โดยประสิทธิภาพการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์จะขึ้นอยู่กับสถานะในการปรับสภาพด้วยต่างและสถานะในการย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเอนไซม์ ส่วนของเหลวนั้นเป็นของเหลือทิ้งจากการปรับสภาพ ซึ่งในการศึกษาในครั้งนี้ ได้ทำการปรับสภาพเปลือกข้าวโพดที่ความเข้มข้น 0.05, 0.1, 0.25 และ 1 โมลาร์ หลังจากการปรับสภาพด้วยต่างที่ความเข้มข้นต่างๆ แล้วนำส่วนใสที่ได้ไปตรวจสอบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS ได้ผลดังรูปที่ 4.1 พบว่า ส่วนใสที่ได้จากการปรับสภาพด้วยต่างโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์  $3.76 \pm 0.01$  กรัมต่อลิตร ส่วนใสที่ได้จากการปรับสภาพด้วยต่างโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์  $4.95 \pm 0.01$  กรัมต่อลิตร ส่วนใสที่ได้จากการปรับสภาพด้วยต่างโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้น 0.25 โมลาร์ ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์  $6.23 \pm 0.01$  กรัมต่อลิตร และส่วนใสที่ได้จากการปรับสภาพด้วยต่างโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์  $6.1 \pm 0.01$  กรัมต่อลิตร จากการปรับสภาพด้วยต่างที่ความเข้มข้นแตกต่างกันปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากส่วนในก็มีปริมาณแตกต่างกัน และคาดว่าปริมาณน้ำตาลที่ได้น่าจะเป็นน้ำตาลที่ได้จากเฮมิเซลลูโลสของเปลือกข้าวโพด ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Mosier และคณะ (2005) ที่พบว่า การปรับสภาพด้วยต่างนั้นจะส่งผลให้เฮมิเซลลูโลสและลิกนินบางส่วนถูกย่อยสลายกลายเป็นโมเลกุลขนาดเล็กละลายลงในสารละลายต่าง ส่วนเซลลูโลสยังคงเป็นองค์ประกอบหลักของลิกโนเซลลูโลสที่ไม่ถูกย่อยสลาย จึงทำให้ในสารละลายต่างนั้นมีปริมาณของน้ำตาลรีดิวซ์เพียงเล็กน้อย

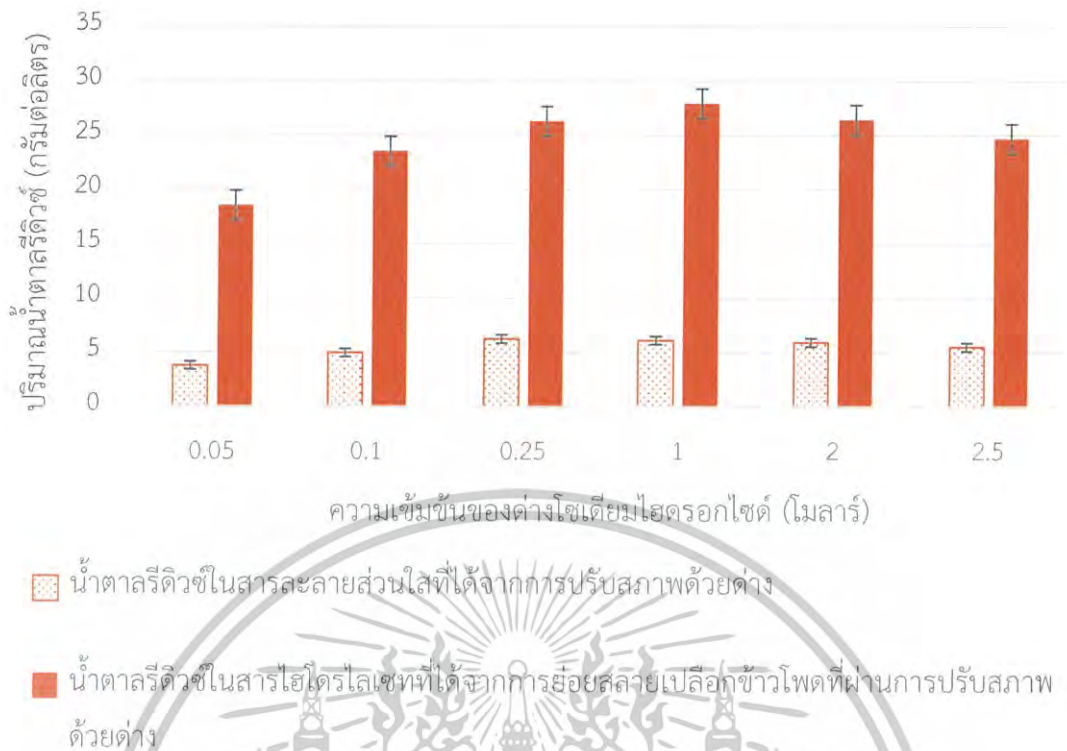
#### 4.1.2 การศึกษาผลของการใช้เอนไซม์เซลลูเลสทางการค้าย่อยสลายเปลือกข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพแล้ว

จากการศึกษาของ Mosier และคณะ (2005) รายงานว่า การย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส เป็นวิธีการที่ให้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสสูงซึ่งเหมาะแก่การนำไปผลิตกรดอินทรีย์ โดยเซลลูโลสไลติกเอนไซม์ (1,4-  $\beta$ -D-glucan glucanohydrolase) เป็นกลุ่มเอนไซม์ที่ประกอบด้วยเอนไซม์ 3 ชนิด แต่ละชนิดนี้จะมีความจำเพาะเจาะจงในการทำปฏิกิริยาสูง เช่น เอนไซม์ Endo-1,4-  $\beta$ -D-glucanase (CMCase) ทำหน้าที่ย่อยโมเลกุลของเซลลูโลสทั้งที่อยู่ในรูปเป็นระเบียบและไม่เป็นระเบียบ (amorphous) รวมทั้งโมเลกุลของเซลโลโอลิโกเมอร์ที่ตำแหน่ง  $\beta$ -1,4 แบบสุ่มทำให้ได้อิโกลแซคคาไรด์ และเซลโลโบไออส เอนไซม์ Exo-1,4-  $\beta$ -D-glucanase (FPase) เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ร่วมกับเอนไซม์ Endo-1,4-  $\beta$ -D-glucanase ในการย่อยโมเลกุลของเซลลูโลสโดยย่อยจากปลายด้านที่ไม่มีหมู่น้ำตาลรีดิวซ์หรือปลายด้านที่มีหมู่น้ำตาลรีดิวซ์ (Karim และคณะ, 2015) ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายส่วนใหญ่คือน้ำตาลเซลโลโบไออส และ  $\beta$ -D-Glucoside glucanohydrolase (cellobiase) ทำหน้าที่ย่อยโมเลกุลของเซลโลโบไออสและเซลโลโอลิโกแซคคาไรด์สายสั้นๆ ให้เป็นกลูโคส (Maneesri, 1994) สำหรับงานวิจัยในครั้งนี้จะเลือกใช้เอนไซม์ที่มีชื่อว่า ACCELLERASE

1500 (Dupont, 2013) โดยเอนไซม์ชนิดนี้เป็นเอนไซม์ประเภทคอมเพล็กซ์ และที่มีจุดประสงค์เฉพาะสำหรับการย่อยสลายวัสดุลิกโนเซลลูโลส โดยจะมีส่วนผสมของเอนไซม์หลายๆชนิด เช่น เอกโซกลูคาเนส (exoglucanase) เอนโดกลูคาเนส (endoglucanase) เฮมิเซลลูเลส (hemi-cellulase) เบต้า-กลูโคซิเดส (betaglucosidase) และอื่นๆที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายวัสดุลิกโนเซลลูโลส และย่อยคาร์โบไฮเดรตที่ไม่ใช่แป้ง ซึ่งจะย่อยสลายโครงสร้างของลิกโนเซลลูโลส ที่ประกอบด้วย เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และกลูแคน โดยเอนไซม์ ACCELLEASE 1500 จะทำการย่อยสลายลิกโนเซลลูโลส ให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่เหมาะสมสำหรับการหมักและเป็นตัวการเปลี่ยนสถานะของแข็งให้เป็นของเหลวและลดความหนืดของวัตถุดิบตั้งต้น รวมทั้งยังสามารถย่อยสลายวัสดุลิกโนเซลลูโลสอื่นๆ เช่น เปลือกข้าวโพดและชังข้าวโพด ชานอ้อย ฟางข้าวสาลี เศษไม้ และอื่นๆ ทั้งหมดนี้สามารถกลายเป็นสารไฮโดรไลเซตได้ด้วยการใช้เอนไซม์ ACCELLERASE 1500 การศึกษาในครั้งนี้เมื่อทำการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ ACCELLEASE 1500 โดยการเจือจางเอนไซม์ด้วยซิเตรตบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้น 0.1 โมลาร์และค่าพีเอชเท่ากับ  $4.8 \pm 0.02$  หลังจากนั้นเติมสารละลาย Carboxymethylcellulose (CMC) ที่ความเข้มข้น ร้อยละ 1 โดยปริมาตร ในปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ต่อหลอด แล้วพบว่ามีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ CMCase เท่ากับ 48.05 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

จากนั้นนำ ACCELLEASE 1500 ไปใช้ในการย่อยเปลือกข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพด้วยด่างโซเดียมไฮดรอกไซด์ โดยใช้เอนไซม์ 48.05 ยูนิตต่อเปลือกข้าวโพดที่ใช้เป็นซับสเตรท 0.5 กรัม ในซิเตรตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ที่มีค่าพีเอชเท่ากับ  $4.8 \pm 0.02$  จากนั้นนำไปต้มที่อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาทีเพื่อเป็นการหยุดการทำงานของเอนไซม์ จึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เพื่อกำจัดตะกอนส่วนที่ไม่ละลาย ส่วนใสที่ได้จะถูกนำไปวัดน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS ผลที่ได้ดังรูปที่ 4.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.1 แผนภูมิแสดงปริมาณน้ำตาลรีตวซ์ในสารละลายส่วนใสที่ได้จากการปรับสภาพด้วยด่างและปริมาณน้ำตาลรีตวซ์ในสารไฮโดรไลเซทที่ได้จากการย่อยสลายเปลือกข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพด้วยด่าง

จากรูป 4.1 น้ำตาลรีตวซ์ที่วัดได้จากสารไฮโดรไลเซทที่ได้จากการย่อยสลายเปลือกข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพด้วยด่างโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ได้ปริมาณน้ำตาลรีตวซ์  $18.5 \pm 0.14$  กรัมต่อลิตร สารไฮโดรไลเซทที่ได้จากการย่อยสลายเปลือกข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพด้วยด่างโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ได้ปริมาณน้ำตาลรีตวซ์  $23.5 \pm 0.25$  กรัมต่อลิตร สารไฮโดรไลเซทที่ได้จากการย่อยสลายเปลือกข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพด้วยด่างโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้น 0.25 โมลาร์ ได้ปริมาณน้ำตาลรีตวซ์  $26.3 \pm 0.22$  กรัมต่อลิตรและสารไฮโดรไลเซทที่ได้จากการย่อยสลายเปลือกข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพด้วยด่างโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ได้ปริมาณน้ำตาลรีตวซ์  $27.92 \pm 0.28$  กรัมต่อลิตร จากการใช้เอนไซม์เซลลูเลสทางการค้าย่อยสลายเปลือกข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพด้วยความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณน้ำตาลรีตวซ์ที่ได้ต่างกันและขึ้นกับความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับการปรับสภาพ และคาดว่าน้ำตาลรีตวซ์ที่ได้จะเป็นน้ำตาลที่ได้จากการย่อยสลายของโครงสร้างเซลลูโลส เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ Sun และ Cheng (2002) ที่รายงานไว้ว่า เมื่อทำการปรับสภาพด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้นสูงขึ้นไปยังสามารถทำให้โครงสร้างของลิกโนเซลลูโลสเกิดการพองบวมมากขึ้น (swollen) ซึ่งนำไปสู่การเพิ่มพื้นที่ผิวภายในวัสดุลิกโน-เซลลูโลส อีกทั้งยังช่วยลดโครงสร้างแบบผลึก (crystalline structure) ของไม่วากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งยังมีให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เซลลูโลส โดยมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ นั่นคือจะทำให้เอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลายเซลลูโลส สามารถแทรกเข้าสู่ชั้นสเตรททำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น ปริมาณน้ำตาลที่ได้หลังจากการย่อยด้วยเอนไซม์ ก็จะมากขึ้นไปด้วย

เมื่อทำการเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในสารไฮโดรไลเซตที่ได้จากการใช้ Accellerase Enzyme 1500 ย่อยสลายเปลือกข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพด้วยต่างโซเดียมไฮดรอกไซด์ พบว่า ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในสารไฮโดรไลเซตที่ได้จากเปลือกข้าวโพดที่ถูกปรับสภาพด้วยต่างโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้น 1 โมลาร์ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด ดังนั้นในการศึกษาต่อไปจึงเลือกใช้สารไฮโดรไลเซตที่ได้จากการใช้เอนไซม์เซลลูเลสทางการค้าย่อยสลายเปลือกข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพด้วยต่างโซเดียมไฮดรอกไซด์

## 4.2 ผลของการศึกษาการใช้สารไฮโดรไลเซตเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตกรดมาลิกในพลาสติกโดยแบคทีเรียไอโซเลต FX1

### 4.2.1 ผลของการศึกษาการผลิตกรดมาลิกโดยใช้สารไฮโดรไลเซตเป็นแหล่งคาร์บอน

เมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียไอโซเลต FX1 ในอาหารเหลวสูตร calcium malate production (Khan และคณะ, 2014) ซึ่งการศึกษาก่อนหน้านี้ โดย ขญาณี และคณะ (2559) พบว่า สามารถผลิตกรดมาลิกที่อยู่ในรูปแคลเซียมมาเลตให้ค่าผลได้ (Yield) สูงที่สุด โดยการศึกษาครั้งนี้จะทำการปรับเปลี่ยนแหล่งคาร์บอนจากน้ำตาลไซโลสเป็นสารไฮโดรไลเซตที่ได้จากการย่อยสลายเปลือกข้าวโพดที่มีน้ำตาลรีดิวซ์ 120 กรัมต่อลิตร และใช้หัวเชื้อร้อยละ 10 โดยปริมาตร ซึ่งมีค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรเท่ากับ 0.786 โดยสารไฮโดรไลเซตที่ได้จากการทดลองในข้อ 4.1.2 มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์อยู่ที่ประมาณ 25 กรัมต่อลิตร จึงทำการต้มเพื่อระเหยน้ำให้ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 120 กรัมต่อลิตรตามที่ต้องการ จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงที่สภาวะเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 วัน โดยเก็บตัวอย่างทุกๆ 2 วัน นำตัวอย่างที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 9000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกตะกอนเซลล์และแคลเซียมคาร์บอเนตที่เหลือออก เนื่องจากหมู่ฟังก์ชันของกรดมาลิกที่ผลิตได้มีการจับกับแคลเซียมคาร์บอเนตในอาหาร ผลผลิตที่ได้จึงอยู่ในรูปของแคลเซียมมาเลต (Khan และคณะ, 2014) ดังนั้นจึงนำส่วนใสที่ได้มาวิเคราะห์หาปริมาณแคลเซียมมาเลตด้วยวิธีการไทเทรต ตรวจสอบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS และตรวจสอบพีเอชด้วยเครื่องวัดพีเอช (pH meter) ได้ผลดังตารางที่ 4.1

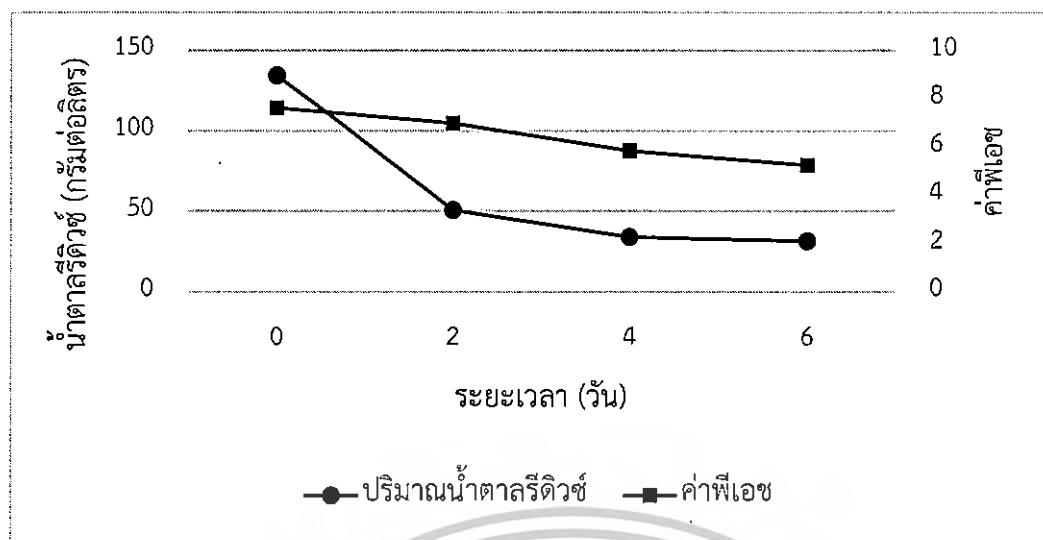
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 แสดงปริมาณแคลเซียมมาเลต ผลไม้ และอัตราการผลิต ตามลำดับ

แหล่งคาร์บอน	แคลเซียมมาเลต (กรัมต่อลิตร)	ผลไม้ (กรัมแคลเซียมมาเลตต่อ กรัมน้ำตาลรีดิวซ์ที่ถูกใช้)	อัตราการผลิต (กรัมต่อลิตรต่อ ชั่วโมง)
สารไฮโดรไลเซท	8.333 ± 0.37	0.081 ± 0.003	0.057 ± 0.00

จากตารางที่ 4.1 แสดงปริมาณแคลเซียมมาเลต ผลไม้ และอัตราการผลิต เมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียไอโซเลต FX1 ในอาหารเหลวสูตร calcium malate production (Khan และคณะ, 2014) โดยใช้สารไฮโดรไลเซทจากเปลือกข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอนจะพบว่าสามารถผลิตกรดมาลิกในรูปของแคลเซียมมาเลตได้เพียง 8.333 ± 0.37 กรัมต่อลิตร มีผลไม้เท่ากับ 0.081 ± 0.003 กรัมต่อกรัม และมีอัตราการผลิตเท่ากับ 0.057 ± 0.00 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ซึ่งพบว่าแบคทีเรียไอโซ-เลต FX1 นั้นสามารถนำสารไฮโดรไลเซทจากเปลือกข้าวโพดมาเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อเปรียบเทียบกับรายงานของ Zou และคณะ (2015) ที่ใช้สารไฮโดรไลเซทจากซังข้าวโพดมาเป็นแหล่งคาร์บอนโดยใช้เชื้อ *Aureobasidium pullulans* YJ 6-11 ซึ่งสามารถผลิตกรดมาลิกได้สูงถึง 32.4 กรัมต่อลิตร โดยทั่วไปแล้วสารไฮโดรไลเซทอาจมีสารยับยั้งบางอย่าง เช่น 5-hydroxymethylfurfural, กรดอะซิติก และสารประกอบฟีนอลิก ที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ จึงอาจทำให้เซลล์ไม่สามารถสร้างผลิตภัณฑ์ออกมาได้เท่าที่ควร ทำให้ได้ผลผลิตที่น้อย นอกจากนี้มีกราฟแสดงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ และพีเอชในน้ำเลี้ยงของแบคทีเรียไอโซเลต FX1 ที่ทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 6 วัน ดังรูปที่ 4.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.2 แสดงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ และค่าพีเอชในน้ำเลี้ยงของไอโซเลต FX1 ณ วันต่างๆ โดยเฉพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร calcium malate production (Khan และคณะ, 2014)

จากรูปที่ 4.2 พบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มีการลดลงอย่างต่อเนื่อง โดยเริ่มต้นมีน้ำตาลรีดิวซ์อยู่ที่  $134.5 \pm 1.41$  กรัมต่อลิตร วันที่ 2 เหลือน้ำตาลอยู่  $50.85 \pm 0.07$  กรัมต่อลิตร วันที่ 4 และวันที่ 6 เหลือน้ำตาลรีดิวซ์อยู่  $33.95 \pm 0.07$  และ  $31.7 \pm 0.14$  กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เช่นเดียวกันกับค่าพีเอชที่มีการลดลงอย่างต่อเนื่อง โดยเริ่มต้นมีค่าพีเอชเท่ากับ 7.62 วันที่ 2 ลดลงเหลือ 6.98 วันที่ 4 และวันที่ 6 ลดลงเหลือ 5.81 และ 5.25 ตามลำดับ ซึ่งสามารถอธิบายได้ว่า การที่ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงอาจเกิดจากการที่เขื่อน้ำตาลไปใช้ในการเจริญเติบโตและการนำน้ำตาลเข้าสู่วัฏจักรภายในเซลล์เพื่อนำไปผลิตกรดอินทรีย์แล้วมีการส่งกรดอินทรีย์ออกมาออกเซลล์ทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีการปะปนกับน้ำเลี้ยงจึงทำให้ค่าพีเอชมีการลดลงจากค่าเริ่มต้น ซึ่งมีความใกล้เคียงกับงานวิจัยของ Ma และคณะ (2013) ที่กล่าวไว้ว่าปริมาณน้ำตาลที่ลดลงอาจเกิดจากแบคทีเรียที่เรี่ยนำน้ำตาลไปใช้ในการเจริญเติบโต สร้างกรดอินทรีย์ และสารเมตาบอไลต์ต่างๆ ขณะที่ค่าพีเอชลดลงในวันที่ 1 และค่อนข้างคงที่ถึงวันที่ 2 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Battat และคณะ (1991) ที่กล่าวว่าในระยะที่มีการผลิตชีวมวลจะส่งผลให้ค่าพีเอชในช่วงระยะเวลา 2 วันแรกมีแนวโน้มลดลง จากนั้นปริมาณน้ำตาลจะเริ่มลดลงเพียงเล็กน้อย อาจเกิดจากปริมาณไนโตรเจนและสารอาหารอื่นๆ ในระบบหมด ทำให้น้ำตาลที่เหลือในระบบจะถูกนำไปใช้ในการผลิตกรดมาลิก (Knuf และคณะ, 2014)

#### 4.2.2 ผลของการศึกษาการผลิตกรดมาลิกโดยการใช้สารไฮโดรไลเซทร่วมกับน้ำตาลกลูโคสหรือไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอน

จากการศึกษาของ Wang และคณะ (2018) ได้ศึกษาการใช้สารไฮโดรไลเซทร่วมกับน้ำตาลเอกสเป็นแหล่งคาร์บอน เทียบกับการใช้สารไฮโดรไลเซทเพียงอย่างเดียวเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าการใช้คาร์บอนไม่สารไฮโดรไลเซทร่วมกับน้ำตาลนั้นจะถูกใช้ไปพร้อมๆกัน เมื่อทำการตรวจสอบในการผลิตพบว่ามีการใช้

ใช้น้ำตาลได้เร็วขึ้นและผลผลิตของผลิตภัณฑ์นั้นยังได้ในปริมาณที่เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับการใช้สารไฮโดรไลเซทเพียงอย่างเดียวเป็นแหล่งคาร์บอน ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จะใช้สารไฮโดรไลเซทที่ได้จากการย่อยสลายเปลือกข้าวโพดที่มีน้ำตาลรีดิวซ์ 25 กรัมต่อลิตรร่วมกับน้ำตาลกลูโคส 75 กรัมต่อลิตร สารไฮโดรไลเซทที่ได้จากการย่อยสลายเปลือกข้าวโพดที่มีน้ำตาลรีดิวซ์ 25 กรัมต่อลิตรร่วมกับน้ำตาลไซโลส 75 กรัมต่อลิตร และสารไฮโดรไลเซทที่ได้จากการย่อยสลายเปลือกข้าวโพดที่มีน้ำตาลรีดิวซ์ 25 กรัมต่อลิตรร่วมกับน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลไซโลส อย่างละ 37.5 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน ตามลำดับ และใช้หัวเชื้อร้อยละ 10 โดยปริมาตร ซึ่งมีค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรเท่ากับ 0.846 จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงที่สภาวะเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 วัน โดยเก็บตัวอย่างวันที่ 0 และวันที่ 6 จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 9000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกตะกอนเซลล์และแคลเซียมคาร์บอเนตที่เหลือออก เนื่องจากหมูฟังกซ์ชันของกรดมาลิกที่ผลิตได้มีการจับกับแคลเซียมคาร์บอเนตในอาหาร ผลผลิตที่ได้จึงอยู่ในรูปของแคลเซียมมาเลต (Khan และคณะ, 2014) ดังนั้นจึงนำส่วนใสที่ได้มาวิเคราะห์หาปริมาณแคลเซียมมาเลตด้วยวิธีการไทเทรต ตรวจสอบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS และตรวจสอบพีเอชด้วยเครื่องวัดพีเอช (pH meter) ได้ผลดังตารางที่ 4.2

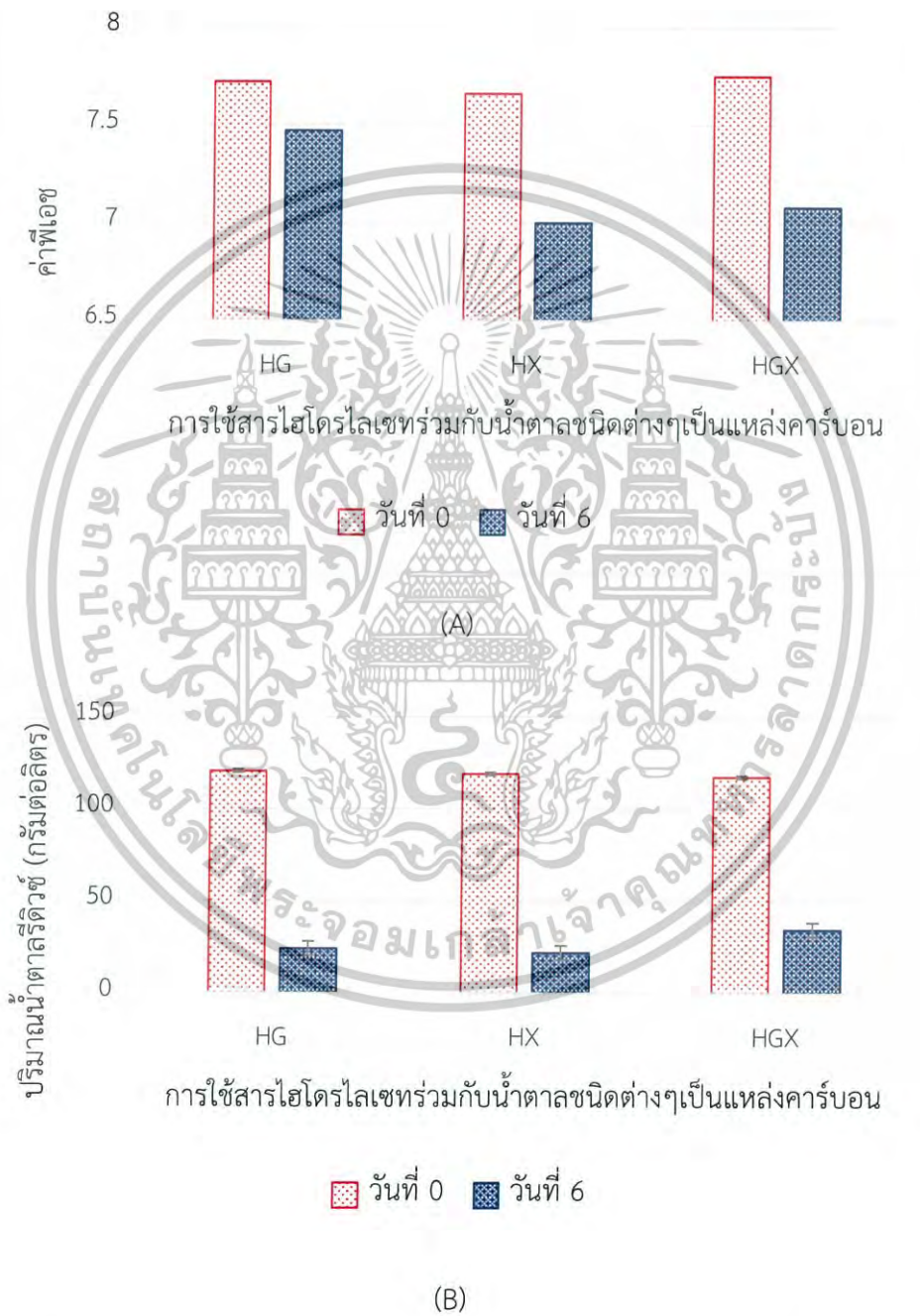
ตารางที่ 4.2 แสดงปริมาณแคลเซียมมาเลต ผลได้ และอัตราการผลิต ตามลำดับ

แหล่งคาร์บอน	แคลเซียมมาเลต (กรัมต่อลิตร)	ผลได้ (กรัมแคลเซียม มาเลตต่อกรัม น้ำตาลรีดิวซ์ที่ถูก ใช้)	อัตราการผลิต (กรัมต่อลิตร ต่อชั่วโมง)
สารไฮโดรไลเซทร่วมกับน้ำตาล กลูโคส (HG)	16.513 <sup>b</sup> ± 0.47	0.171 <sup>b</sup> ± 0.00	0.114 <sup>b</sup> ± 0.00
สารไฮโดรไลเซทร่วมกับน้ำตาล ไซโลส (HX)	20.458 <sup>a</sup> ± 1.12	0.210 <sup>a</sup> ± 0.01	0.142 <sup>a</sup> ± 0.00
สารไฮโดรไลเซทร่วมกับน้ำตาล กลูโคสและน้ำตาลไซโลส (HGX)	19.289 <sup>a</sup> ± 0.98	0.206 <sup>a</sup> ± 0.01	0.133 <sup>a</sup> ± 0.00

หมายเหตุ ตัวอักษรที่เหมือนกันในสดมภ์เดียวกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ จากการเปรียบเทียบด้วยวิธี Duncan's ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

จากตารางที่ 4.2 แสดงปริมาณแคลเซียมมาเลต ผลได้ และอัตราการผลิตเมื่อเพาะเลี้ยงไอโซเลต FX1 ในอาหารเหลวสูตร calcium malate production ที่มีการปรับเปลี่ยนแหล่งคาร์บอน จากสารไฮโดรไลเซทเพียงอย่างเดียวเป็นสารไฮโดรไลเซทร่วมกับน้ำตาลกลูโคส สารไฮโดรไลเซท

ร่วมกับน้ำตาลไซโลส และสารไฮโดรไลเซทร่วมกับน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอน นอกจากนี้ได้มีการเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ และค่าพีเอชในน้ำเลี้ยงของไอโซเลต FX1 ที่ทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 6 วัน ดังรูปที่ 4.3 และเปรียบเทียบปริมาณแคลเซียมมาเลตที่ผลิตได้และผลได้ของสารไฮโดรไลเซทร่วมกับน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอน ดังรูปที่ 4.4



รูปที่ 4.3 แสดงค่าพีเอช (A) และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ (B) ของน้ำเลี้ยงไอโซเลต FX1 เติบโตในสื่อเพาะเลี้ยงที่มีแหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน โดยเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ และค่าพีเอชในน้ำเลี้ยงของไอโซเลต FX1 ที่ทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 6 วัน ดังรูปที่ 4.3 และเปรียบเทียบปริมาณแคลเซียมมาเลตที่ผลิตได้และผลได้ของสารไฮโดรไลเซทร่วมกับน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอน ดังรูปที่ 4.4

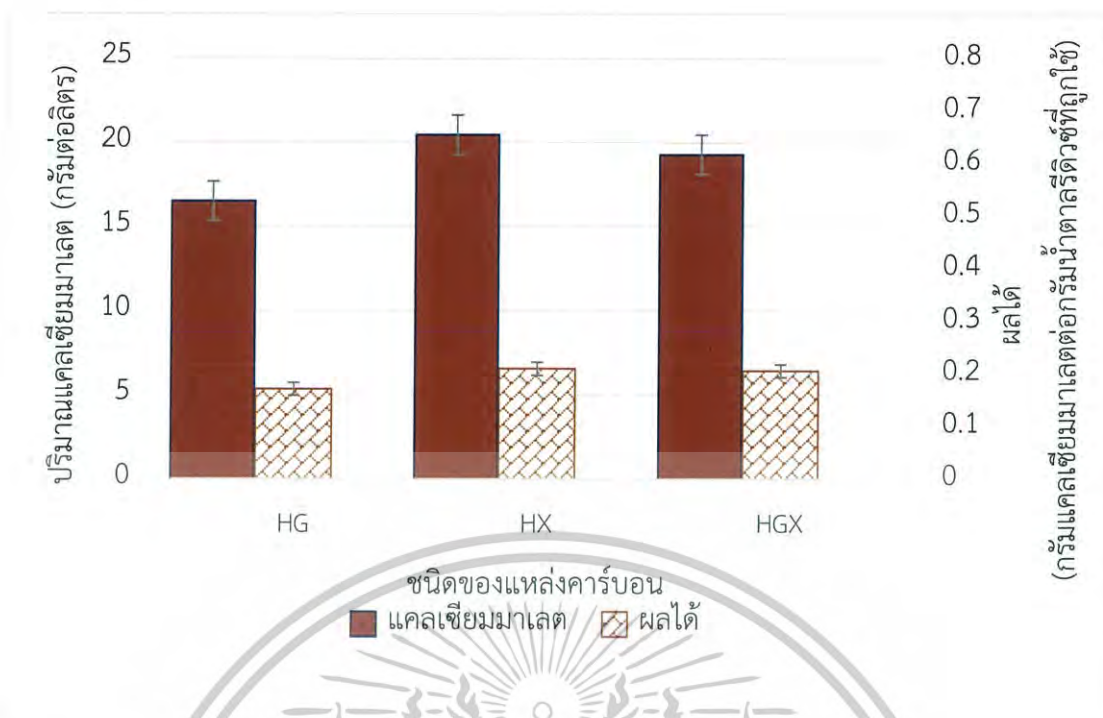
หมายเหตุ ; HG = สารไฮโดรไลเซทร่วมกับน้ำตาลกลูโคส, HX = สารไฮโดรไลเซทร่วมกับน้ำตาลไซโลส, HGX = สารไฮโดรไลเซทร่วมกับน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลไซโลส

จากรูปที่ 4.3 จะเห็นว่าเมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียโอโซเลต FX1 ในอาหารสูตร calcium malate production (Khan และคณะ, 2014) โดยใช้สารไฮโดรไลเซทร่วมกับน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน โดยเริ่มต้นมีน้ำตาลอยู่  $120.50 \pm 0.00$  กรัมต่อลิตร และในวันที่ 6 เหลือน้ำตาลอยู่เพียง  $24.15 \pm 0.84$  กรัมต่อลิตร ในขณะที่ค่าพีเอชเริ่มต้นอยู่ที่ 7.72 และในวันที่ 6 ค่าพีเอชลดลงเหลืออยู่ที่ 7.47

เมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียโอโซเลต FX1 ในอาหารเหลวสูตร calcium malate production (Khan และคณะ, 2014) โดยใช้สารไฮโดรไลเซทร่วมกับน้ำตาลไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอน โดยเริ่มต้นมีน้ำตาลอยู่  $119.00 \pm 0.00$  กรัมต่อลิตร และในวันที่ 6 เหลือน้ำตาลอยู่เพียง  $21.90 \pm 0.84$  กรัมต่อลิตร ในขณะที่ค่าพีเอชเริ่มต้นอยู่ที่ 7.66 และในวันที่ 6 ค่าพีเอชลดลงเหลืออยู่ที่ 7.00

เมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียโอโซเลต FX1 ในอาหารเหลวสูตร calcium malate production (Khan และคณะ, 2014) โดยใช้สารไฮโดรไลเซทร่วมกับน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอน โดยเริ่มต้นมีน้ำตาลอยู่  $117.50 \pm 0.70$  กรัมต่อลิตร และในวันที่ 6 เหลือน้ำตาลอยู่เพียง  $24.25 \pm 0.21$  กรัมต่อลิตร ในขณะที่ค่าพีเอชเริ่มต้นอยู่ที่ 7.75 และในวันที่ 6 ค่าพีเอชลดลงเหลืออยู่ที่ 7.08

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.4 แสดงปริมาณแคลเซียมมาเลตและผลได้ เมื่อเพาะเลี้ยงไอโซเลต FX1 ในสารไฮโดรไลเซทร่วมกับน้ำตาลแต่ละชนิด เป็นระยะเวลา 6 วัน โดย ■ คือ ปริมาณแคลเซียมมาเลตที่ผลิตได้ และ ▨ คือ ผลได้

หมายเหตุ ; HG = สารไฮโดรไลเซทร่วมกับน้ำตาลกลูโคส, HX = สารไฮโดรไลเซทร่วมกับน้ำตาลไซโลส, HGX = สารไฮโดรไลเซทร่วมกับน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลไซโลส

จากรูปที่ 4.4 แสดงปริมาณแคลเซียมมาเลตที่ผลิตได้ และผลได้เมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียไอโซเลต FX1 ในอาหารเหลวสูตร calcium malate production (Khan และคณะ, 2014) โดยใช้สารไฮโดรไลเซทร่วมกับน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน จะสามารถผลิตแคลเซียมมาเลตได้  $16.513 \pm 0.47$  กรัมต่อลิตร ให้ผลได้เท่ากับ  $0.171 \pm 0.05$  กรัมต่อกรัม มีอัตราการผลิต  $0.114 \pm 0.00$  กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

เมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียไอโซเลต FX1 ในอาหารเหลวสูตร calcium malate production (Khan และคณะ, 2014) โดยใช้สารไฮโดรไลเซทร่วมกับน้ำตาลไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอนจะสามารถผลิตแคลเซียมมาเลตได้  $20.458 \pm 1.12$  กรัมต่อลิตร ผลได้เท่ากับ  $0.210 \pm 0.01$  กรัมต่อกรัม มีอัตราการผลิต  $0.142 \pm 0.00$  กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

เมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียไอโซเลต FX1 ในอาหารเหลวสูตร calcium malate production (Khan และคณะ, 2014) โดยใช้สารไฮโดรไลเซทร่วมกับน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอนจะสามารถผลิตแคลเซียมมาเลตได้  $19.289 \pm 0.98$  กรัมต่อลิตร ผลได้เท่ากับ  $0.206 \pm 0.01$  กรัมต่อกรัม มีอัตราการผลิต  $0.133 \pm 0.00$  กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ซึ่งจากรายงานของไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Zhu และคณะ (2002) กล่าวว่า ในการใช้น้ำตาลกลูโคสร่วมกับน้ำตาลไซโลสนั้น การเมแทบอลิซึมของกลูโคสและไซโลสของแบคทีเรียจะเกิดควบคู่กันไป แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียไม่ได้ชอบแหล่งคาร์บอนชนิดใดมากกว่ากัน ซึ่งในระยะแรกจะมีการใช้กลูโคสได้เร็วกว่า แต่การใช้ไซโลสก็จะเกิดขึ้นหลังจากความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสเริ่มลดลงหรือใกล้หมดไป ซึ่งอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ที่แตกต่างกันในน้ำตาลที่แตกต่างกันอาจเป็นเพราะความสามารถในการใช้น้ำตาลไซโลสนั้นต้องมีการใช้พลังงานมากขึ้นในการขนส่งไซโลสผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ โดยจากการทดลองพบว่าเมื่อใช้สารไฮโดรไลเซทร่วมกับน้ำตาลไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอน ไอโซเลต FX1 จะผลิตแคลเซียมมาเลตและให้ผลได้สูงสุดเมื่อเทียบกับแหล่งคาร์บอนอีก 2 ชนิด ดังนั้นในการศึกษาต่อไปจึงเลือกใช้สารไฮโดรไลเซทร่วมกับน้ำตาลไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอน

#### 4.3 การศึกษาผลของปริมาณแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดมาลิกโดยแบคทีเรียไอโซเลต FX1

จากรายงานการศึกษาอัตราส่วนระหว่างแหล่งคาร์บอนต่อไนโตรเจนของ Knuf และคณะ (2013) พบว่าการจำกัดปริมาณของไนโตรเจนจะช่วยให้มีการสังเคราะห์เอนไซม์มาเลตดีไฮโดรจิเนส (Malate dehydrogenase) ที่บริเวณไซโตซอล (Cytosol) เพิ่มขึ้นส่งผลให้เกิดกระบวนการผลิตกรดมาลิก ในบริเวณดังกล่าวมากขึ้นด้วย ดังนั้นในการศึกษานี้จึงทำการศึกษาผลของปริมาณแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดมาลิกของไอโซเลต FX1 โดยใช้สารไฮโดรไลเซทร่วมกับน้ำตาลไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งในอาหารเหลวสูตร Calcium malate production มี Corn steep liquor เป็นแหล่งไนโตรเจนเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยปริมาตร ดังนั้นจึงทำการปรับปริมาณแหล่งไนโตรเจนที่ใช้ คือ Corn steep liquor โดยจะใช้ปริมาณไนโตรเจนร้อยละ 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 และ 0.6 โดยปริมาตร ตามลำดับ และใช้หัวเชื้อร้อยละ 10 โดยปริมาตร ซึ่งมีค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรเท่ากับ 0.963 จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงที่สภาวะเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 วัน โดยเก็บตัวอย่างทุกๆ 2 วัน จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 9000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกตะกอนเซลล์และแคลเซียมคาร์บอเนตที่เหลือออก เนื่องจากหมูฟงก์ชันของกรดมาลิกที่ผลิตได้มีการจับกับแคลเซียมคาร์บอเนตในอาหาร ผลผลิตที่ได้จึงอยู่ในรูปของแคลเซียมมาเลต (Khan และคณะ, 2014) ดังนั้นจึงนำส่วนใสที่ได้มาวิเคราะห์หาปริมาณแคลเซียมมาเลตด้วยวิธีการไทเทรต ตรวจสอบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS และตรวจสอบพีเอชด้วยเครื่องวัดพีเอช (pH meter) ได้ผลดังตารางที่ 4.3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

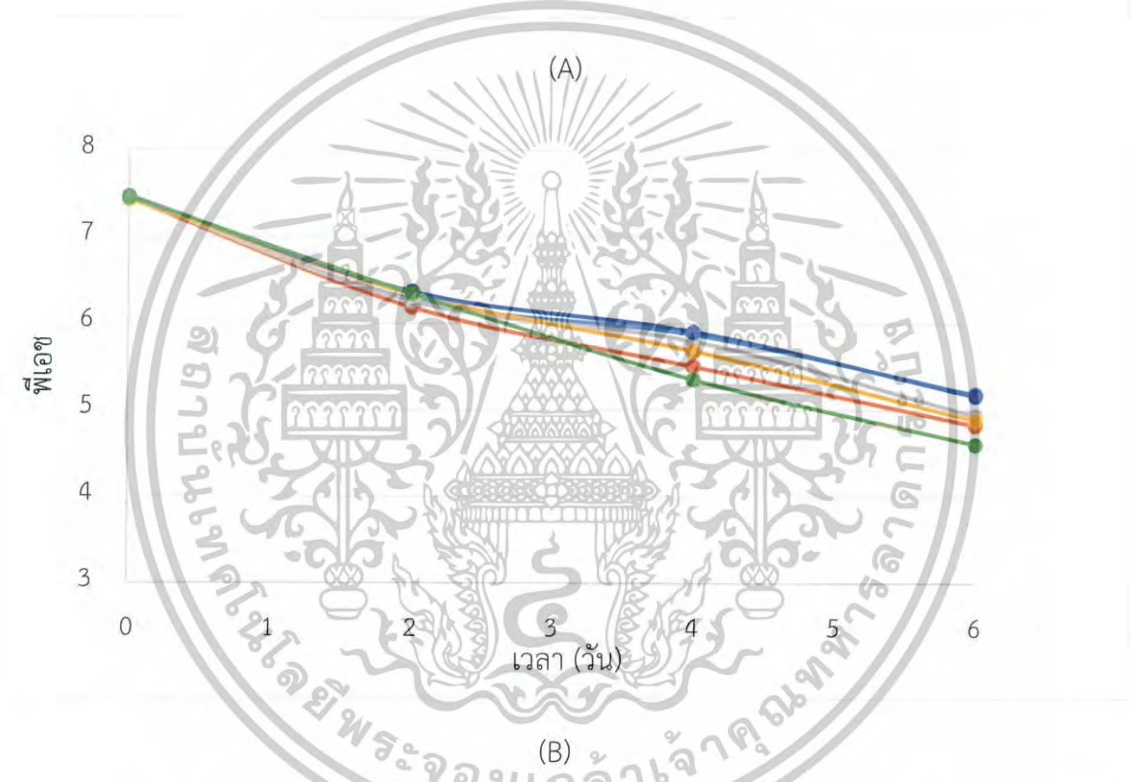
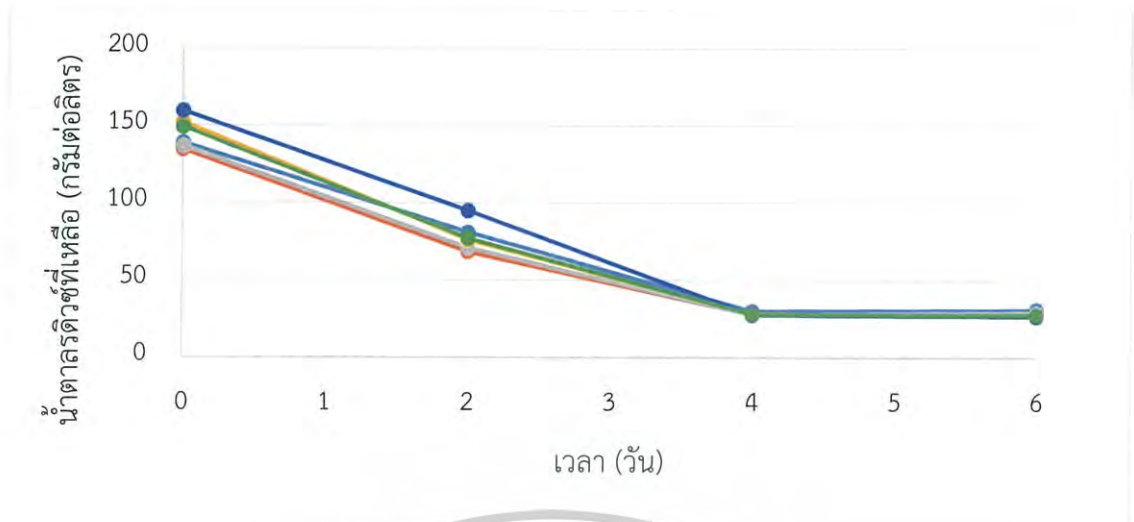
ตารางที่ 4.3 แสดงปริมาณแคลเซียมมาเลต ผลได้ และอัตราการผลิต เมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย ไอโซเลต FX1 ในอาหารที่มีสารไฮโดรไลเซทร่วมกับน้ำตาลไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอน และมีปริมาณ ไนโตรเจนที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 6 วัน

ปริมาณแหล่ง ไนโตรเจน (ร้อยละโดย ปริมาตร)	แคลเซียมมาเลต (กรัมต่อลิตร)	ผลได้ (กรัมแคลเซียมมาเลต ต่อกรัมน้ำตาลรีดิวซ์ ถูกใช้)	อัตราการผลิต (กรัมต่อลิตร ต่อชั่วโมง)
0.1	23.601 <sup>bc</sup> ± 0.09	0.219 <sup>b</sup> ± 0.03	0.163 <sup>bc</sup> ± 0.00
0.2	23.297 <sup>b</sup> ± 0.75	0.222 <sup>b</sup> ± 0.07	0.165 <sup>b</sup> ± 0.00
0.3	21.309 <sup>c</sup> ± 1.13	0.197 <sup>c</sup> ± 0.01	0.147 <sup>cd</sup> ± 0.00
0.4	38.820 <sup>a</sup> ± 1.63	0.311 <sup>a</sup> ± 0.01	0.269 <sup>a</sup> ± 0.01
0.5	22.261 <sup>bc</sup> ± 1.44	0.167 <sup>d</sup> ± 0.01	0.154 <sup>bcd</sup> ± 0.01
0.6	21.160 <sup>c</sup> ± 1.89	0.174 <sup>d</sup> ± 0.01	0.146 <sup>d</sup> ± 0.01

หมายเหตุ ตัวอักษรที่เหมือนกันในสดมภ์เดียวกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ จากการเปรียบเทียบด้วยวิธี Duncan's ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

จากตารางที่ 4.3 แสดงปริมาณแคลเซียมมาเลต ผลได้ และอัตราการผลิตเมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย ไอโซเลต FX1 ในอาหารเหลวสูตร calcium malate production (Khan และคณะ, 2014) โดยใช้สารไฮโดรไลเซทร่วมกับน้ำตาลไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอน มี Corn steep liquor เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน นอกจากนี้ได้มีการเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือและค่าพีเอชในน้ำเลี้ยงของไอโซเลต FX1 ที่ทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 6 วัน ดังรูปที่ 4.5 และเปรียบเทียบปริมาณแคลเซียมมาเลตที่ผลิตได้ และผลได้ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีปริมาณแหล่งไนโตรเจนความเข้มข้นแตกต่างกัน ดังรูปที่ 4.6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.5 แสดงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ (A) และค่าพีเอช (B) ของน้ำเลี้ยงไอโซเลต FX1 ณ เวลาต่างๆ โดยเฉพาะเลี้ยงในสารไฮโดรไลเซทร่วมกับน้ำตาลไซโลส ที่มีปริมาณแหล่งไนโตรเจนร้อยละ 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 และ 0.6 โดยปริมาตร ตามลำดับ

- โดย —●— คือ ปริมาณแหล่งไนโตรเจนร้อยละ 0.1 โดยปริมาตร
- คือ ปริมาณแหล่งไนโตรเจนร้อยละ 0.2 โดยปริมาตร
- คือ ปริมาณแหล่งไนโตรเจนร้อยละ 0.3 โดยปริมาตร
- คือ ปริมาณแหล่งไนโตรเจนร้อยละ 0.4 โดยปริมาตร
- คือ ปริมาณแหล่งไนโตรเจนร้อยละ 0.5 โดยปริมาตร
- คือ ปริมาณแหล่งไนโตรเจนร้อยละ 0.6 โดยปริมาตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานภายในเท่านั้น เมื่อผู้ยัดให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งยังมีผลผูกพันกับเงื่อนไขการใช้งานของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากรูปที่ 4.5 เมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียไอโซเลต FX1 ในอาหารเหลวสูตร calcium malate production (Khan และคณะ, 2014) โดยใช้สารไฮโดรไลเซทร่วมกับน้ำตาลไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอน มี Corn steep liquor เป็นแหล่งไนโตรเจนร้อยละ 0.1 โดยปริมาตร โดยเริ่มต้นมีน้ำตาลรีดิวซ์อยู่  $138.75 \pm 2.65$  กรัมต่อลิตร มีปริมาณน้ำตาลลดลงอย่างรวดเร็วในวันที่ 0 และวันที่ 2 ค่อยๆลดลงจนถึงวันที่ 4 และค่อนข้างคงที่ถึงวันที่ 6 เหลือน้ำตาลรีดิวซ์อยู่  $31.09 \pm 1.28$  กรัมต่อลิตร ขณะที่ค่าพีเอชเริ่มต้นอยู่ที่ 7.44 ได้มีการลดลงอย่างรวดเร็วในวันที่ 2 และค่อยๆลดลงถึงวันที่ 4 และค่อนข้างคงที่ถึงวันที่ 6 ซึ่งค่าพีเอชเท่ากับ 5.19

เมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียไอโซเลต FX1 ในอาหารเหลวสูตร calcium malate production (Khan และคณะ, 2014) โดยใช้สารไฮโดรไลเซทร่วมกับน้ำตาลไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอน มี Corn steep liquor เป็นแหล่งไนโตรเจนร้อยละ 0.2 โดยปริมาตร โดยเริ่มต้นมีน้ำตาลรีดิวซ์อยู่  $134.37 \pm 3.97$  กรัมต่อลิตร มีปริมาณน้ำตาลลดลงอย่างรวดเร็วในวันที่ 0 และวันที่ 2 ค่อยๆลดลงจนถึงวันที่ 4 และค่อนข้างคงที่ถึงวันที่ 6 เหลือน้ำตาลรีดิวซ์อยู่  $27.21 \pm 0.75$  กรัมต่อลิตร ขณะที่ค่าพีเอชเริ่มต้นอยู่ที่ 7.44 ได้มีการลดลงอย่างรวดเร็วในวันที่ 2 และค่อยๆลดลงถึงวันที่ 4 และค่อนข้างคงที่ถึงวันที่ 6 ซึ่งค่าพีเอชเท่ากับ 4.83

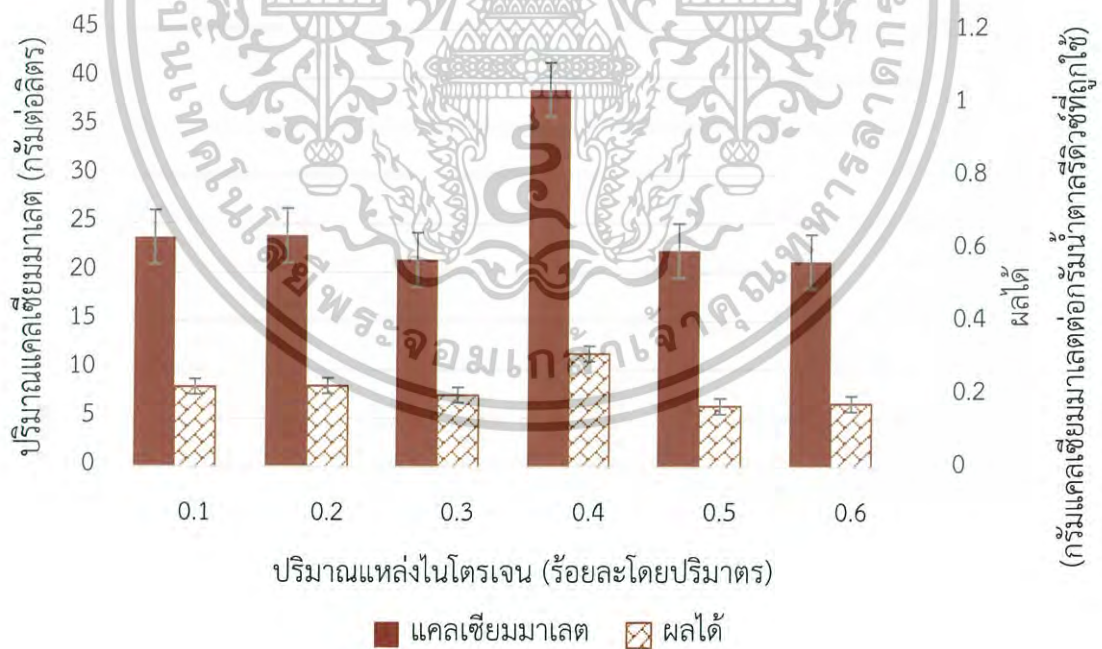
เมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียไอโซเลต FX1 ในอาหารเหลวสูตร calcium malate production (Khan และคณะ, 2014) โดยใช้สารไฮโดรไลเซทร่วมกับน้ำตาลไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอน มี Corn steep liquor เป็นแหล่งไนโตรเจนร้อยละ 0.3 โดยปริมาตร โดยเริ่มต้นมีน้ำตาลรีดิวซ์อยู่  $136.56 \pm 2.20$  กรัมต่อลิตร มีปริมาณน้ำตาลลดลงอย่างรวดเร็วในวันที่ 0 และวันที่ 2 ค่อยๆลดลงจนถึงวันที่ 4 และค่อนข้างคงที่ถึงวันที่ 6 เหลือน้ำตาลรีดิวซ์อยู่  $28.93 \pm 0.97$  กรัมต่อลิตร ขณะที่ค่าพีเอชเริ่มต้นอยู่ที่ 7.45 ได้มีการลดลงอย่างรวดเร็วในวันที่ 2 และค่อยๆลดลงถึงวันที่ 4 และค่อนข้างคงที่ถึงวันที่ 6 ซึ่งค่าพีเอชเท่ากับ 4.94

เมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียไอโซเลต FX1 ในอาหารเหลวสูตร calcium malate production (Khan และคณะ, 2014) โดยใช้สารไฮโดรไลเซทร่วมกับน้ำตาลไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอน มี Corn steep liquor เป็นแหล่งไนโตรเจนร้อยละ 0.4 โดยปริมาตร โดยเริ่มต้นมีน้ำตาลรีดิวซ์อยู่  $151.87 \pm 0.60$  กรัมต่อลิตร มีปริมาณน้ำตาลลดลงอย่างรวดเร็วในวันที่ 0 และวันที่ 2 ค่อยๆลดลงจนถึงวันที่ 4 และค่อนข้างคงที่ถึงวันที่ 6 เหลือน้ำตาลรีดิวซ์อยู่  $27.28 \pm 0.83$  กรัมต่อลิตร ขณะที่ค่าพีเอชเริ่มต้นอยู่ที่ 7.43 ได้มีการลดลงอย่างรวดเร็วในวันที่ 2 และค่อยๆลดลงถึงวันที่ 4 และค่อนข้างคงที่ถึงวันที่ 6 ซึ่งค่าพีเอชเท่ากับ 4.89

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียไอโซเลต FX1 ในอาหารเหลวสูตร calcium malate production (Khan และคณะ, 2014) โดยใช้สารไฮโดรไลเซทร่วมกับน้ำตาลไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอน มี Corn steep liquor เป็นแหล่งไนโตรเจนร้อยละ 0.5 โดยปริมาตร โดยเริ่มต้นมีน้ำตาลรีดิวซ์อยู่  $159.37 \pm 10.60$  กรัมต่อลิตร มีปริมาณน้ำตาลลดลงอย่างรวดเร็วในวันที่ 0 และวันที่ 2 ค่อยๆ ลดลงจนถึงวันที่ 4 และค่อนข้างคงที่ถึงวันที่ 6 เหลือน้ำตาลรีดิวซ์อยู่  $26.84 \pm 0.30$  กรัมต่อลิตร ขณะที่ค่าพีเอชเริ่มต้นอยู่ที่ 7.46 ได้มีการลดลงอย่างรวดเร็วในวันที่ 2 และค่อยๆ ลดลงถึงวันที่ 4 และค่อนข้างคงที่ถึงวันที่ 6 ซึ่งค่าพีเอชเท่ากับ 5.17

เมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียไอโซเลต FX1 ในอาหารเหลวสูตร calcium malate production (Khan และคณะ, 2014) โดยใช้สารไฮโดรไลเซทร่วมกับน้ำตาลไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอน มี Corn steep liquor เป็นแหล่งไนโตรเจนร้อยละ 0.6 โดยปริมาตร โดยเริ่มต้นมีน้ำตาลรีดิวซ์อยู่  $149.06 \pm 2.65$  กรัมต่อลิตร มีปริมาณน้ำตาลลดลงอย่างรวดเร็วในวันที่ 0 และวันที่ 2 ค่อยๆ ลดลงจนถึงวันที่ 4 และค่อนข้างคงที่ถึงวันที่ 6 เหลือน้ำตาลรีดิวซ์อยู่  $27.28 \pm 1.72$  กรัมต่อลิตร ขณะที่ค่าพีเอชเริ่มต้นอยู่ที่ 7.45 ได้มีการลดลงอย่างรวดเร็วในวันที่ 2 และค่อยๆ ลดลงถึงวันที่ 4 และค่อนข้างคงที่ถึงวันที่ 6 ซึ่งค่าพีเอชเท่ากับ 4.61



รูปที่ 4.6 แสดงปริมาณแคลเซียมมาเลตที่ผลิตได้และผลได้ เมื่อเพาะเลี้ยงไอโซเลต FX1 ในสาร

ไฮโดรไลเซทร่วมกับน้ำตาลไซโลส ที่มีปริมาณแหล่งไนโตรเจนต่างๆ เป็นระยะเวลา 6 วัน โดยเอกสารนี้เป็นเอกสารทสวงวนเวสสำหรับการศึกษาเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้นำไปเผยแพร่โดยไม่คิดค่า  
ไม่คิดค่าปริมาณแคลเซียมมาเลตที่ผลิตได้ และผลได้ อ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากรูปที่ 4.6 แสดงปริมาณแคลเซียมมาเลตที่ผลิตได้ และผลได้เมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียไอโซเลต FX1 ในสารไฮโดรไลเซทร่วมกับน้ำตาลไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอน มี Corn steep liquor เป็นแหล่งไนโตรเจนร้อยละ 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 และ 0.6 โดยปริมาตร ตามลำดับ พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงไอโซเลต FX1 ในสารไฮโดรไลเซทร่วมกับน้ำตาลไซโลสที่มีปริมาณแหล่งไนโตรเจนร้อยละ 0.4 โดยปริมาตร โดยแบคทีเรียไอโซเลต FX1 สามารถผลิตแคลเซียมมาเลตได้สูงสุด  $38.82 \pm 1.63$  กรัมต่อลิตร และมีค่าผลได้เท่ากับ  $0.311 \pm 0.01$  กรัมต่อกรัม ซึ่งแสดงว่าปริมาณแหล่งไนโตรเจนก็มีผลต่อการผลิตกรดมาลิก เมื่อเทียบกับรายงานของ Li และคณะ (2016) ที่พบว่า อัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนต่อ Corn steep liquor ที่ใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน เมื่อใช้ปริมาณแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมสามารถเพิ่มองค์ประกอบของธาตุอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดอินทรีย์ เนื่องจากถ้าหากปริมาณแหล่งไนโตรเจนมากเกินไป เชื้อจะเอาไปใช้ในการเจริญเติบโตสำหรับการสร้างเซลล์เพียงอย่างเดียว ถ้าหากปริมาณแหล่งไนโตรเจนน้อยเกินไปเชื้อจะมีการเจริญเติบโตน้อยเกินไปอาจส่งผลต่อการผลิตกรดอินทรีย์ที่น้อยเกินไป ดังนั้นปริมาณแหล่งไนโตรเจนร้อยละ 0.4 โดยปริมาตร จึงมีความเหมาะสมต่อการผลิตแคลเซียมมาเลตของไอโซเลต FX1 ซึ่งใช้ Corn steep liquor เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยสารอาหารที่มีไนโตรเจนนั้นเป็นสิ่งจำเป็นที่เซลล์จะต้องนำไปใช้ในการสร้างเซลล์ ซ่อมแซมรักษาเซลล์ อีกทั้งยังใช้ในกระบวนการเมทาบอลิซึม และผลิตเอนไซม์คาร์โบไฮเดรตไฮโดรไลซิส (Hamilton และคณะ, 2017) โดยจากรายงานของ Ochsenreither และคณะ (2014) รายงานว่าการผลิตกรดอินทรีย์จะเริ่มขึ้นหลังจากที่ไนโตรเจนลดลง ซึ่งหมายถึงหลังจากที่เชื้อมีการเจริญเติบโตเมื่อเชื้อเพิ่มขึ้นจะทำให้มีการผลิตกรดมากขึ้น แต่การที่มีปริมาณไนโตรเจนมากเกินไปหรือน้อยเกินไปอาจส่งผลให้เชื้อมีการเจริญเติบโตที่น้อยลง จนทำให้ผลิตกรดออกมาได้ลดลง หรือผลิตได้ในปริมาณที่จำกัด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 5

# สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

### 5.1 สรุปผลการวิจัย

1. จากการศึกษาผลของการปรับสภาพเปลือกข้าวโพดด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้น 0.05 0.1 0.25 1 2 และ 2.5 โมลาร์ พบว่าเปลือกข้าวโพดที่ปรับสภาพด้วยต่างความเข้มข้น 1 โมลาร์ แล้วนำไปย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสทางการค้าโดยใช้เอนไซม์ 48 ยูนิตต่อเปลือกข้าวโพด 0.5 กรัม ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในสารไฮโดรไลเซทสูงสุดเท่ากับ  $27.92 \pm 0.28$  กรัมต่อลิตร

2. จากการศึกษากระบวนการผลิตกรดมาลิกโดยใช้สารไฮโดรไลเซทอย่างเดียวยเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าไอโซเลต FX1 สามารถผลิตแคลเซียมมาเลตได้  $8.333 \pm 0.37$  กรัมต่อลิตร มีผลได้เท่ากับ  $0.081 \pm 0.003$  กรัมต่อกรัม และมีอัตราการผลิตเท่ากับ  $0.057 \pm 0.00$  กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

3. จากการศึกษากระบวนการผลิตกรดมาลิกโดยใช้สารไฮโดรไลเซทร่วมกับน้ำตาลกลูโคสหรือไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเมื่อใช้สารไฮโดรไลเซทร่วมกับน้ำตาลไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอน ไอโซเลต FX1 สามารถผลิตแคลเซียมมาเลตออกมาได้สูงสุดคือ  $20.458 \pm 1.12$  กรัมต่อลิตร มีผลได้เท่ากับ  $0.210 \pm 0.01$  กรัมต่อกรัม และมีอัตราการผลิตเท่ากับ  $0.142 \pm 0.00$  กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

4. จากการศึกษาผลของปริมาณแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดมาลิกของไอโซเลต FX1 โดยเฉพาะเลี้ยงในอาหารสูตร calcium malate production ที่ใช้ Corn steep liquor เป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่าสามารถผลิตแคลเซียมมาเลตได้สูงที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีปริมาณไนโตรเจนร้อยละ 0.4 โดยปริมาตร ซึ่งสามารถให้ผลผลิตแคลเซียมมาเลตเท่ากับ  $38.820 \pm 1.63$  กรัมต่อลิตร มีผลได้เท่ากับ  $0.311 \pm 0.01$  กรัมต่อกรัม และมีอัตราการผลิต  $0.269 \pm 0.01$  กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 5.2 ข้อเสนอแนะ

1. ควรทำการศึกษาปัจจัยต่างๆที่อาจส่งผลต่อการผลิตกรดมาลิก เช่น อุณหภูมิ ความเร็วรอบในการเขย่า และชนิดของแหล่งไนโตรเจน เป็นต้น

2. อาจใช้แหล่งวัสดุกลีโคเซลลูโลสชนิดอื่นๆ เช่น ชังข้าวโพด ชานอ้อย เปลือกไม้ยูคาลิปตัส เปลือกถั่วลิสง และฟางข้าว เป็นต้น เพื่อใช้เป็นสารไฮโดรไลเซทในการนำมาเป็นแหล่งคาร์บอน

3. ควรวิเคราะห์องค์ประกอบในสารไฮโดรไลเซทด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) เพื่อจะได้ทราบองค์ประกอบที่แน่ชัดซึ่งอาจส่งผลต่อการผลิตกรดมาลิก



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## เอกสารอ้างอิง

ชญาณี มุลมงคล ตลยา มาตรฐาน ตลลญา เหมือนเปลื้อง. 2559. “การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมบางประการต่อการผลิตกรดมาลิก โดยแบคทีเรียที่คัดแยกได้” โครงการพิเศษระดับวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม บัณฑิตวิทยาลัย, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า เจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

ประภัตสร เทพกัณฑ์ และสุพรรณนิภา ยอดสง่า. 2557. “การคัดแยกจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตกรดอะดีปิกจากแหล่งธรรมชาติ.” โครงการพิเศษระดับวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม บัณฑิตวิทยาลัย, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

วัชรีย์ คตินนทกุล และ เจนจิรา ภูริรักษ์พิติกร. 2556. “การปรับสภาพเปลือกข้าวโพดและเปลือกมะพร้าวด้วยของเหลวไอออนิกเพื่อเพิ่มผลผลิตน้ำตาลกลูโคส.” กรมวิทยาศาสตร์บริการ.

วิกิพีเดีย สารานุกรมเสรี. 2560. ข้าวโพด. (ออนไลน์).แหล่งที่มา : <https://th.wikipedia.org/wiki/> วันที่สืบค้น 25 พฤษภาคม 2561.

สารานุกรมไทยสำหรับเยาวชน. 2557. ชนิดของข้าวโพด. (ออนไลน์).แหล่งที่มา : <http://kanchanapisek.or.th/kp6/sub/book/book.8.html>. วันที่สืบค้น 25 พฤษภาคม 2561.

สุขใจ ชูจันทร์. 2554. “การผลิตกรดอินทรีย์จากวัสดุเหลือใช้มวลชีวภาพ.” พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2560. สถิติการปลูกข้าวโพดในประเทศไทย. (ออนไลน์).แหล่งที่มา : <http://statbbi.nso.go.th/staticreport/page/sector/th/> วันที่สืบค้น 7 มิถุนายน 2561.

Abe, S. Furuya, A. Saito, T. and Takayama, K. 1962. “Method of producing l-malic acid by fermentation.” U.S. patent 3,063,910.

Acher, B.D. Connerton, F.I. and Mackenzie, A.D. 2008. “Filamentous fungi for production of food additives and processing acids.” Advance in a

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นอนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า Biochemical Engineering and Biotechnology, 111 : 99-147.  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมีเหตุเปลี่ยนแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Alvira, Tomas-Pejo., P.E., Ballesteros., M., and Nergro., M.J. 2010. "Pretreatment technology for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review." *Bioresource Technology*. 101: 4851-4861.
- Balat, M. 2011. "Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway." A review, *Energy Convers. Manage.* 52: 858-875.
- Battat, E. Peleg, Y. Bercovitz, A. Rokem, J.S. and Goldberg, I. 1991. "Optimization of l-malic acid production by *Aspergillus flavus* in a stirred fermentor." *Biotechnology and Bioengineering*. 37 : 1108–1116.
- Barl B, Costas G , E Donald , W Macgregor. "Combined chemical and enzymic treatments of corn husk lignocellulosics." *Science of food*. 56 : 195-214.
- Brodeur, G., Yau, E., Badal, K., Collier, J., Ramachandran, K.B. and Ramakrishnan, S. 2011. "Chemical and physicochemical pretreatment of lignocellulosic biomass." A review, *Enzyme Research* 1: 1-17.
- Chen, B.Y., Chen, S.W. and Wang, H.T. 2012. "Use of different alkaline pretreatments and enzyme models to improve low-cost cellulosic biomass conversion." *Biomass and Bioenergy*. 39 : 182-191.
- Cheng, C. Zhou, Y. Lin, M. Wei, P. and 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.
- Cheng, J., 2009. "Biomass to Renewable Energy Processes." Taylor and Francis Group, New York.
- Cheng, K.K. Zhao, X.B. Zeng, J. Wu, R.C. Xu, Y.Z. Liu, D.H. and Zhang, J.A. 2012. "Downstream processing of biotechnological produced succinic acid." *Applied Microbiology and Biotechnology*. 95 : 841–850.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Dai Z., H. Zhou, S. Zhang., H. Gu, Q. Yang., W. Zhang., W. Dong., J. Ma., Y. Fang., M. Jing., F. Xin. 2018. "Current advance in biological production of malic acid using wild type and metabolic engineered strains." *Bioresource Technology*. 258 : 345-353.
- Dashtban, M., Schraft, H. and Qin, W.2009. "Fungal bioconversion of lignocellulosic Residues ; opportunities & perspectives." *International Journal Of Biological Science* 5 : 578-595.
- Dave, A. and Patel, H. H. 2003. "Impact of different carbon and nitrogen sources on phosphate solubilization by *Pseudomonas fluorescens*." *Indian Journal of Microbiology*. 43 : 33-36.
- David L. Kirchman. 2012. "Processes in microbial ecology." United States. oxford University Press Inc., New York.
- Doyle, E.M. 1999. "Use of organic acids to control *Listeria* in meat." *American Meat Institute Foundation*. 651(1) : 1-39.
- Food And Agriculture Organization Of The United Nations. 2006. *Combined compendium of food additive specifications 67<sup>th</sup>*. Italy : Viale delle Terme di Caracalla.
- Fatichenti, F. Farris, G. A. Deiana, P. and Ceccarelli, S. 1984. "Malic acid production and consumption by selected strains of *Saccharomyces cerevisiae* under anaerobic and aerobic conditions." *Applied Microbiology Biotechnology*. 19 : 427-429.
- Garrett, H. Reginald, Grisham and M. Charles, 2008. "Biochemistry 4th edition." Boston : Twayne Publishers.
- Goldberg, I. Rokem, J.S. and Pines, O. 2006. "Organic acids: Old metabolites, new themes." *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 81 : 1601-1611.
- Hendriks A., Zeeman G. 2009. "Pretreatments to enhance the digestibility of lignocelluloses biomass." *Bioresource Technology*. 100 (1) : 10-18.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Hronska, H. Tokosova, S. Pilnikova, A. Kristofikova, L. Rosenberg, M. 2015. "Bioconversion of fumaric acid to l-malic acid by the bacteria of the genus *Nocardia*." *Applied Journal Biochemistry and Biotechnology*. 175 : 266-273.

Iyyappan, J. Bharathiraja, B. Baskar, G. Jayamuthunagai, J. Barathkumar, S. and Anna, R. 2017. "Malic acid production by chemically induced *Aspergillus niger* MTCC 281 mutant from crude glycerol." *Bioresource Technology*. 251 : 264-267.

Jain, P. and Vigneshwaran, N., 2012. "Effect of Fenton's pretreatment on cotton cellulosic substrates to enhance its enzymatic hydrolysis response." *Bioresource Technology*. 103 : 219-226.

Jensen, P.A., Stuart, J.R., Goodpaster, M.P., Goodman, J.W. and Simmons, M.J. 2008. "Cytotype regulation of P transposable elements in *Drosophila melanogaster*: Repressor polypeptides or piRNAs." *Genetics*. 179 (4) : 1785–1793.

Jung, Y.H., Kim, I.J., Kim, H.K. and Kim, K.H. 2013. "Dilute acid pretreatment of lignocellulose for whole slurry ethanol fermentation." *Bioresource Technology*. 132: 109-114.

Kawagoe, M. Hyakumura, K. Suye, S. I. Miki, K. and Naoe, K. 1997. "Application of bubble column fermentors to submerged culture of *Schizophyllum commune* for production of l-malic acid." *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 84 : 333–336.

Keshwani, D.R. 2009. "Microwave pretreatment of switchgrass for bioethanol production. Thesis Dissertation." North Carolina State University.

Khan, I. Nazir, K. Wang, Z.P. Liu, G.L. and Chi, Z.N. 2014. "Calcium malate overproduction by *Penicillium viticola* 152 using the medium containing corn steep liquor." *Applied Journal Microbiology and Biotechnology*. 98(4) : 1539-1549.

Kim Y, Hendrickson R, Mosier NS, Ladisch MR, Bals B, Balan V, Dale BE. 2008.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

and AFEX pretreated distillers' grains at high-solids loadings.”

Bioresource Technology. 99 (12) : 5206-5215.

Knuf, C. 2014. “Malic acid production by *Aspergillus oryzae*.” Chemical and Biological engineering. 6 : 1-60.

Knuf, C. Nookaew, I. Brown, S.H. McCulluch, M. Berry, A. Nielsen, J. 2013. “Investigation of malic acid production in *Aspergillus oryzae* under nitrogen starvation conditions.” Applied and Environmental Microbiology. 79 (19) : 6050-6058.

Koz Yamamoto, Tetsuya Tosa, Kiyokazu Yamashita, Ichiro Chibata. 1976. “Continuous production of L-malic acid by immobilized *Brevibacterium ammoniagenes* cells.” European journal of applied microbiology and a biotechnology. 3 : 169-183.

Kumar, P., Barrett, D.M., Delwiche, M.J. and Stroeve, P. 2009. “Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production.” Industrial & Engineering Chemistry Research. 48 : 3713-3729.

Kumar S, Singh, S.P., Mishra, I.M. and Adhikari, D.K. 2011. “Continuous ethanol production by *Kluyveromyces* sp. IIPE453 immobilized on bagasse chips in packed bed reactor.” Journal of Petroleum Technology and Alternative Fuels, 2(1) : 1-6.

Kusch, S. Morar, M.V. 2009. “Integration of lignocellulosic biomass into renewable energy generation concepts.” Pro Environment. 2 : 32-37.

Liu, S.J. Steinbuchel, A. 1997. “Production of poly(malic acid) from different carbon sources and its regulation in *Aureobasidium pullulans*.” Biotechnology Letters. 19 : 11-14.

Lowry, O. H. Rosebrongh, N. J. Farr, A. L. and Randall, R. L. 1951. “Protein measurement with the Folin-Ciocalteu's phenol reagent.” A

Journal of Biological Chemistry. 13 : 265-275.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการศึกษาวิจัยเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Lumyong, S. Tomita, F. 1993. "L-malic acid production by an albino strain *Monascus araneosus*." World Journal Microbiol Biotechnol. 9 : 383-384.
- Maneesri, J. 1994. "Production and applications of xylanase an cellulose from palm cake and sludge by *Aspergillus niger* ATCC 6275." Master of Science Thesis in Biotechnology, Prince of Songkla University.
- March, J. Brow, H.W. 2017. "Carboxylic acid chemical compound." Encyclopaedia Britannica, Inc. 1 : 1-2.
- Markus Kunze, Itsara Pracharoenwattana, Steven M.Smith, AndreasHartig. 2006. "A central role for the peroxisomal membrane in glyoxylate cycle function." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research. 1763 : 1441-1552.
- Masahiro kurakake, W.Kisaka ,K.Ouchi, and T. Komaki. 1999. "Pretreatment with Ammonia Water for Enzymatic Hydrolysis of Corn Husk, Bagasse, and Switchgrass." Applied Biochemistry and Biotechnology. 90 : 251-259.
- Miller, G.L. 1959. "Use of Dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar." Journal of Analytical Chemistry. 31 : 426.
- Mondala, A.H. 2015. "Direct fungal fermentation of lignocellulosic biomass into itaconic, fumaric, and malic acid: current and future prospects." Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 42 : 487-506.
- Moon, S.Y. Hong, S.H Kim, T.Y. and Lee, S.Y. 2008. "Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of malic acid." Biochemical Engineering Journal. 40 : 312-320.
- Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y.Y., Holtzapple, M., et al. 2005. "A Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic a biomass." Bioresource Technology. 96: 673-686.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Mtui, G.Y.S. 2009. "A review on recent advances in pretreatment of lignocellulosic wastes and production of value-added products." *African Journal of Biotechnology*. 8(8) : 1398-1415.
- Musa, O.M. 2016. "Handbook of maleic anhydride based materials syntheses." Properties and Applications : 1-6.
- Nakayama, S. Tabata, K. Oba, T. Shinji, K.K. Mitsuiki, Kadokura, T. and Nakazato, A. 2012. "Characteristics of the high malic acid production mechanism in *Saccharomyces cerevisiae* sake yeast strain No 28." *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 114(3) : 281-285.
- Nicholas, J., Antje von S. 2003. "The oxidative pentose phosphate pathway : structure and organization." *Current Opinion in Plant Biology* .6 : 236-246.
- Nordell, B. 2003. "Thermal pollution causes global warming." *Global and Planetary Change* 38 : 305-312.
- Ochsenreither, K. Fischer, C. Neumann, A. and 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 Journal Microbiology and Biotechnology*. 98 : 5449-5460.
- Oliver, J.H., Hyunook, K. and Pen-Chi, C.2000. "Decolorization of wastewater." *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*. 30 : 499-505.
- Peleg, Y. Stieglitz, B. and Goldberg, I. 1988. "Malic acid accumulation by *Aspergillus flavus*." *Applied Microbiology and Biotechnology*. 28 : 69-75.
- Pejo, E.T., Olive, J.M. and Ballesteros, M..2008. "Realistic approach for full-scale bioethanol production from lignocellulose." *A review Journal of Scientific & Industrial Research* 67: 874-884.

Pines, O. Even-Ram, S. Elnathan, N. Battat, E. Aharonov, O. Gibson, D. and Goldberg. I.

1996. "The cytosolic pathway of L-malic acid synthesis in *Saccharomyces*"  
 เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์หรือการเข้าถึงเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อผู้ใช้เห็นใบแจ้งลิขสิทธิ์นี้ กรุณา  
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

*cerevisiae*: The role of fumarase.” *Applied Microbiology Biotechnology*. 46 : 393–399.

Pines, O. Shemesh, S. Battat, E. and Goldberg, I. 1997. “Overexpression of cytosolic malate dehydrogenase (MDH2) causes overproduction of specific organic acids in *Saccharomyces cerevisiae*.” *Applied Microbiology Biotechnology*. 48 : 248–255.

Rama , R. Potumarthi , N.Mekala. 2014. “ Influence of dilute acid and alkali pretreatment on reducing sugar production from corncobs by crude enzymatic method: A comparative study” *Bioresource Technology*. 162 : 213–217.

Rastogi, S.C. 2007. “**Biotechnology.**” Principles and Applications. Oxford, UK: Alpha Science International Ltd.

Sauer M., Porro D., Mattanovich D., Branduardi P. 2008. “Microbial production of organic acids : expanding the markets.” *Trends in Biotechnology*. 26 (2) : 100-108.

Shcell, J. 1997. “Interdependence of pH, malate concentration, and calcium and magnesium concentrations in the xylem sap of beech roots.” *Tree Physiological*. 17 : 479-483.

Schwartz, H. and Radler, F. 1988. “Formation of L(-)malate by *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation.” *Applied Microbiology Biotechnology*. 27 : 553–560.

Shady S. Hassana, Gwilym A. Williamsb, Amit K. Jaiswal. 2018. “Emerging technologies for the pretreatment of lignocellulosic biomass.” *Bioresource Technology*. 262 : 310–318.

Shi J, Lu W. 2013. “Malic acid enriched plant extract.” Beijing CN Patent Application Publication. NO. 2013/0345309 A1. 26 December 2013.

Stoll, V. S. and Blenckard, J. S. 1990. “Buffer : principles and practice.” *Method In Enzymology*. 182 : 24-38.

เอกสารอ้างอิงที่นำมาใช้ทั้งหมดนี้เพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อผู้ใดเห็นประโยชน์ประการใด  
ไม่ว่ากรณีใด กรุณาแจ้งให้ทราบถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Sun, Y. and Cheng, J. 2002. "Hydrolysis of lignocellulosic materials for bioethanol production: review." *Bioresource Technology*. 83 : 1-11.

Tabuchi, T. Sugisawa, T. Lshidori, T. Nakahara, T. and Sugiyama, J. 1981. "Itaconic acid fermentation by a yeast belonging to the genus *Candida*." *Journal of 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*." *Journal European Food Research and Technology*. 224 : 343-347.

Takao, S. Yokota A., and Tanida, M. 1983. "L-Malic acid fermentation by a mixed culture of *Rhizopus arrhizus* and *Paecilomyces varioti*." *Journal of Fermentation Technology*. 61 : 643-645.

Theron, M. and Lues, J.F. 2010. "Organic acids and food preservation." New York : CRC Press. *J. Biotechnol.* 139 : 47-54.

Vongsuvanlert, V. Tani, Y. 1988. "Purification and characterization of xylose isomerase of a methanol yeast *Candida boidinii* which is involved in sorbitol production from glucose." *Agricultural and Biological Chemistry*. 52 : 1817-1824.

Wang ZP, Wang GY, Khan I, Chi ZM. 2013. "High-level production of calcium malate from glucose by *Penicillium sclerotiorum* K302." *Bioresource Technology*. 143 : 674-677.

Wang Y., Cao W., Luo J., Wan Y. 2018. "Exploring the potential of lactic acid production from lignocellulosic hydrolysates with various ratios of hexose versus pentose by *Bacillus coagulans* IPE22." *Bioresource Technology*. 261 : 342-349.

Werpy, T. and Petersen, G. 2004. "Top value added chemicals from biomass."

เอกสารนี้เป็นเอกสารของศูนย์วิจัยและพัฒนาพลังงานทดแทนชีวมวล มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- West, T.P. 2011. "Malic acid production from thin stillage by *Aspergillus* species." *Biotechnology Letters*. 33 : 2463-2467.
- Yang Xing , L. Bu , T. Zheng , S.Liu , J. Jiang.2016. " Enhancement of high-solids enzymatic hydrolysis of corncob residues by bisulfite pretreatment for biorefinery" *Bioresource Technology*. 221 : 461-468.
- Zelle, R. Hulster, M.D. Winden, W.V. Waard, P.D. Dijkema, C. Winkler, A. Geertman, J. Dijken, J.V. Pronk, J. and Maris, A.V. 2008. "Malic acid production by *Saccharomyces cerevisiae*: engineering of pyruvate carboxylation, oxaloacetate reduction, and malate export." *Applied and Environmental Microbiology*. 74 : 2766-2777.
- Zhang, H. Cai, J. Dong, J. Zhang, D. Huang, L. Xu, Z. and Cen, P. 2011a. "High-level production of poly ( $\beta$ -L-malic acid) with a new isolated *Aureobasidium pullulans* strain." *Applied Journal Microbiology and Biotechnology*. 92 : 295-303.
- Zhu, S., Wu, Y., Yu, Z., Wang, C., Yu, F., Jin, S., et al. 2006b. "Comparison of three microwave/chemical pretreatment process for enzymatic hydrolysis of rice a straw." *Biosystems Engineering*. 93: 279-283.
- Zhu, Z. Wu, S. Yang. 2002. "Butyric acid production from acid hydrolysate of corn fibre by *Clostridium tyrobutyricum* in a fibrous-bed bioreactor." *Process Biochemistry*. 38 : 657-666.
- Zou, X. Yanga, J. Tiana, X. Guoc, M. and Li, Z. 2016. "Production of poly malic acid and malic acid from xylose and corncob hydrolysate by a novel *Aureobasidium pullulans* YJ 6-11 strain." *Process Biochemistry*. 51 : 16-23.
- Zou, X. Zhou, Y. and Yang, S.T. 2013. "Production of poly malic acid and malic acid by *Aureobasidium pullulans* fermentation and acid hydrolysis." *Biotechnology and Bioengineering*. 110 : 2105-2113.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



## ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ก

### สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

#### ก1. สูตรอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์

##### ก1.1 สูตรอาหารแข็ง Selective medium (Tabushi และคณะ, 1981)

Glucose หรือ Xylose	100	กรัมต่อลิตร
Yeast extract	5	กรัมต่อลิตร
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1.0	กรัมต่อลิตร
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.5	กรัมต่อลิตร
$\text{CaCO}_3$	10.0	กรัมต่อลิตร
Agar	20.0	กรัมต่อลิตร

##### ก1.2 สูตรอาหารเหลว Calcium malate production (Khan และคณะ, 2014)

Glucose หรือ Xylose	100	กรัมต่อลิตร
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0.1	กรัมต่อลิตร
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.1	กรัมต่อลิตร
KCl	0.5	กรัมต่อลิตร
Corn steep liquor	0.5	ร้อยละโดยปริมาตร
$\text{CaCO}_3$	30	กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ข

## การเตรียมสารเคมี

## ข1. การเตรียมสารละลายกลูโคสมาตรฐาน

1. นำน้ำตาลกลูโคสไปอบไว้ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง หลังจากนั้นทิ้งกลูโคสไว้ให้เย็นในเดซิเคเตอร์เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
2. ชั่งน้ำตาลกลูโคสมา 0.1 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นปริมาณ 50 มิลลิลิตร ลงในบีกเกอร์ และปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยขวดปรับปริมาตร
3. เจือจางสารละลายมาตรฐานกลูโคสให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 200, 400, 600, 800 และ 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังตารางที่ ข1

ตารางที่ ข1 การเตรียมสารละลายมาตรฐานกลูโคส ที่ความเข้มข้น 200, 400, 600, 800 และ 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ความเข้มข้นของ สารละลายกลูโคสมาตรฐาน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	สารละลายกลูโคส มาตรฐาน ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร (มิลลิลิตร)	น้ำกลั่น (มิลลิลิตร)
0	0	5
200	1	4
400	2	3
600	3	2
800	4	1
1000	5	0

4. นำสารละลายกลูโคสมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร และสร้างกราฟมาตรฐาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ข2. การเตรียมสารละลายดีเอ็นเอส (Miller, 1959)

1. ชั่งสาร 3,5-ไดโนโตรซาลิไซลิกปริมาณ 10 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 250 มิลลิลิตร
2. เติมสารละลายต่างที่ละน้อย (โซเดียมไฮดรอกไซด์ 2 โมลาร์ เตรียมได้โดย ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 16 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร)
3. คนสารละลายให้เข้ากันจนหมด จนกระทั่งได้สารละลายใส
4. เติมโพแทสเซียมโซเดียมทาร์เทรตลงไปที่ละน้อยจนครบ 300 กรัม และปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 1000 มิลลิลิตร กรองผ่านกระดาษกรอง และเก็บใส่ไว้ในขวดสีชา

## ข3. การเตรียมสารละลายซีเทรตบัฟเฟอร์ (Stoll และ Blanchard, 1990)

1. สารละลาย A : Citric acid monohydrate ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์

สูตรโมเลกุล  $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$

น้ำหนักมวลโมเลกุล (Mw) 210 กรัมต่อโมล

Citric acid monohydrate ความเข้มข้น 1 โมลาร์ จะชั่งสารมา 210 กรัม

ถ้าต้องการ Citric acid monohydrate 0.1 โมลาร์ จะชั่งสารมา  $\frac{210 \times 0.1}{1} = 21$  กรัม

ดังนั้น ถ้าต้องการสารละลายปริมาตร 100 มิลลิลิตร จะต้องชั่งสารมา 2.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยขวดปรับปริมาตร

2. สารละลาย B : Trisodium citrate dihydrate ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์

สูตรโมเลกุล  $C_6H_5O_7Na_3 \cdot 2H_2O$

น้ำหนักมวลโมเลกุล (Mw) 294.10 กรัมต่อโมล

Trisodium citrate dihydrate ความเข้มข้น 1 โมลาร์ จะชั่งสารมา 294.10 กรัม

ถ้าต้องการ Trisodium citrate dihydrate 0.1 โมลาร์ จะชั่งสารมา  $\frac{294.10 \times 0.1}{1} = 29.4$  กรัม

ดังนั้น ถ้าต้องการสารละลายปริมาตร 100 มิลลิลิตร จะต้องชั่งสารมา 2.94 กรัม ละลายในน้ำกลั่น

50 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยขวดปรับปริมาตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อผู้ผู้ใดเห็นหน้าไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. ผสมสารละลาย A ปริมาณ 40 มิลลิลิตร และสารละลาย B ปริมาณ 60 มิลลิลิตร เข้าด้วยกัน จากนั้นนำไปปรับค่าพีเอชให้ได้เป็น 4.8

#### ข4. การเตรียมสารละลายมาตรฐานของโปรตีน

1. ชั่งสาร bovine serum albumin (BSA) มา 0.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร ในบีกเกอร์ แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
2. เจือจางสารละลายมาตรฐานให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 50, 100, 150, 200 และ 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังตารางที่ ข2

ตารางที่ ข2 การเตรียมสารละลายมาตรฐานของโปรตีน ที่ความเข้มข้น 0, 50, 100, 150, 200 และ 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ความเข้มข้นของ สารละลายมาตรฐาน โปรตีน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	สารละลายมาตรฐานของ โปรตีน ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (มิลลิลิตร)	น้ำกลั่น (มิลลิลิตร)
0	0.00	5.00
50	0.25	4.75
100	0.5	4.50
150	0.75	4.25
200	1.00	4.00
250	1.25	3.75

3. นำสารละลายที่มีความเข้มข้นต่างๆ ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร และสร้างกราฟมาตรฐาน

#### ข5. การเตรียมสารละลายเพื่อหาปริมาณโปรตีน (Lowry, 1951)

1. สารละลาย ก

ละลายโซเดียมคาร์บอเนต 20 กรัมต่อลิตร ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์  
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเตรียมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 โมลาร์ (ปริมาณ 200 มิลลิลิตร)

	สูตรโมเลกุล	NaOH
	น้ำหนักมวลโมเลกุล (Mw)	40 กรัมต่อโมล
คำนวณได้จากสมการ	$\frac{g}{MW}$	$= \frac{CV}{1000}$
	$\frac{g}{40}$	$= \frac{0.1 \times 200}{1000}$
	$g$	$= 0.8$

ดังนั้นจึงต้องชั่งสารโซเดียมไฮดรอกไซด์มา 0.8 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรให้เป็น 200 มิลลิลิตร ตามลำดับ

การเตรียมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 20 กรัมต่อลิตร

เตรียมสารละลาย 1000 มิลลิลิตร จะชั่งสารมา 20 กรัม

ถ้าต้องการเตรียม 200 มิลลิลิตร จะชั่งสารมา  $\frac{20 \times 200}{1000} = 4$  กรัม

ดังนั้นจึงต้องชั่งโซเดียมคาร์บอเนตมา 4 กรัม ละลายในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 200 มิลลิลิตร

2. สารละลาย ข

ละลายคอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร ในสารละลายโซเดียม-โพแทสเซียมทาร์เทรต ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร

การเตรียมสารละลายโซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรต ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร (ปริมาณ 50 มิลลิลิตร)

เตรียมสารละลาย 1000 มิลลิลิตร จะชั่งสารมา 10 กรัม

ถ้าต้องการเตรียม 50 มิลลิลิตร จะชั่งสารมา  $\frac{10 \times 50}{1000} = 0.5$  กรัม

ดังนั้นจึงต้องชั่งสารโซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรตมา 0.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรให้เป็น 50 มิลลิลิตร

การเตรียมสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร

เตรียมสารละลาย 1000 มิลลิลิตร จะชั่งสารมา 5 กรัม

ถ้าต้องการเตรียม 50 มิลลิลิตร จะชั่งสารมา  $\frac{5 \times 50}{1000} = 0.25$  กรัม

ดังนั้นจึงต้องชั่งสารคอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรตมา 0.25 กรัม ละลายในสารละลายโซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรต 50 มิลลิลิตร

3. สารละลาย ค

เอกสารนี้เป็นเอกสารละลายอัลคาไลน์คอปเปอร์ เตรียมโดยผสมสารละลาย ก ปริมาตร 50 มิลลิลิตร กับ สารละลาย ข ปริมาตร 1 มิลลิลิตร (ควรเตรียมเมื่อต้องการใช้) ไม่ว่าจะกรณีใด เอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ข6. การเตรียมสารละลาย Folin Ciocalteu

นำสารละลาย Folin Ciocalteu (ความเข้มข้น 2 โมลาร์) มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:1 โดยต้องการเตรียมสารละลายทั้งหมด 20 มิลลิลิตร จึงใช้ Folin Ciocalteu (ความเข้มข้น 2 โมลาร์) ปริมาณ 10 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร แล้วเก็บไว้ในขวดสีชา ควรเตรียมเมื่อใช้และใช้ได้ภายใน 24 ชั่วโมง

## ข7. การเตรียมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 โมลาร์

สูตรโมเลกุล NaOH

น้ำหนักมวลโมเลกุล (Mw) 40 กรัมต่อโมล

เมื่อต้องการเตรียมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 โมลาร์ จึงต้องชั่งสารโซเดียมไฮดรอกไซด์มา 40 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1000 มิลลิลิตร ด้วยขวดปรับปริมาตร

## ข8. การเตรียมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1.075 โมลาร์

สูตรโมเลกุล NaOH

น้ำหนักมวลโมเลกุล (Mw) 40 กรัมต่อโมล

โซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 โมล จะชั่งสารมา 40 กรัม

โซเดียมไฮดรอกไซด์ 1.075 โมล จะชั่งสารมา  $\frac{40 \times 1.075}{1} = 43$  กรัม

ดังนั้นจึงต้องชั่งสารโซเดียมไฮดรอกไซด์มา 43 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1000 มิลลิลิตร ด้วยขวดปรับปริมาตร

## ข9. การเตรียมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 3.1 โมลาร์

สูตรโมเลกุล HCl

น้ำหนักมวลโมเลกุล (Mw) 36.46 กรัมต่อโมล

ความหนาแน่น (D) 1.18 กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร

ความเข้มข้นกรดซัลฟูริก 36 ร้อยละโดยมวลต่อมวล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากสูตร

$$\text{ความเข้มข้น} = \frac{10dx}{MW}$$

$$= \frac{10 \times 1.18 \times 36}{36.46}$$

ความเข้มข้น = 11.65 โมลาร์

ดังนั้นกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้นร้อยละ 36 โดยมวลต่อมวลจะมีความเข้มข้นเท่ากับ 11.65 โมลาร์  
ถ้าต้องการเตรียมสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 3.1 โมลาร์ ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

จากสูตร

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$V_1 = \frac{3.1 \text{ M} \times 1000 \text{ ml}}{11.65 \text{ M}}$$

$$V_1 = 266.09 \text{ มิลลิลิตร}$$

ฉะนั้นจึงต้องเติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้นร้อยละ 36 โดยมวลต่อมวล ลงในน้ำกลั่น  
ปริมาตร 500 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรให้เป็น 1000 มิลลิลิตร ตามลำดับ

**ข10. การเตรียมสารละลาย Ethylene Diamine Tetraacetic Acid ความเข้มข้น  
0.05 โมลาร์**

สูตรโมเลกุล  $C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2 \cdot 2H_2O$

น้ำหนักมวลโมเลกุล (Mw) 372.24 กรัมต่อโมล

EDTA ความเข้มข้น 1 โมลาร์ จะชั่งสารมา 372.24 กรัม

ถ้าต้องการ EDTA 0.05 โมลาร์ จะชั่งสารมา  $\frac{372.24 \times 0.05}{1} = 18.61$  กรัม

ดังนั้นจึงต้องชั่งสาร Ethylene Diamine Tetraacetic Acid มา 18.61 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 500  
มิลลิลิตร และปรับปริมาตรให้เป็น 1000 มิลลิลิตร ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ค

## การคำนวณที่เกี่ยวข้อง

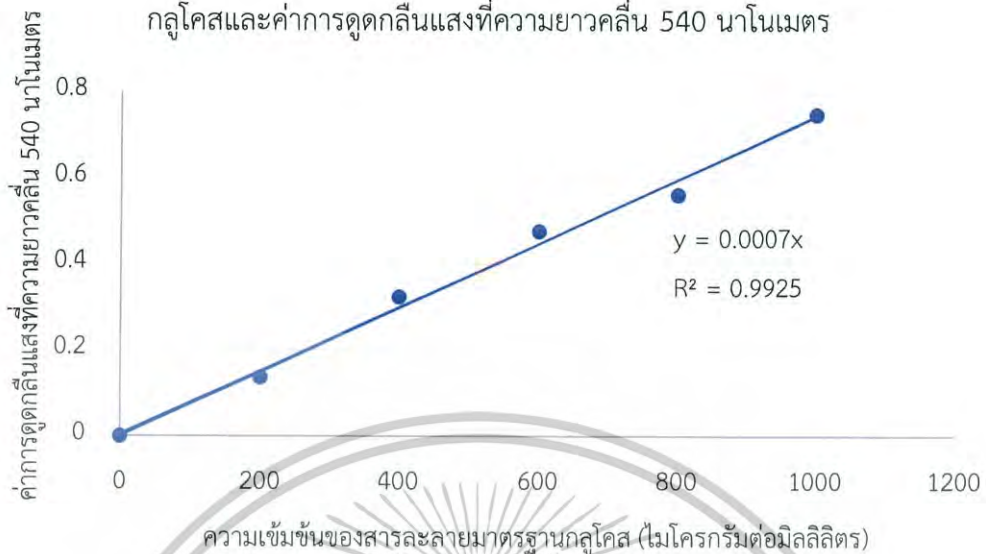
## ค1. การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ CMCase

ตารางที่ ค1 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานกลูโคสที่ความเข้มข้นต่างๆ (ไม่โครกรัมต่อมิลลิลิตร) ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

ความเข้มข้นสารละลาย มาตรฐานกลูโคส (ไม่โครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสง ครั้งที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร (ครั้งที่ 1)	ค่าการดูดกลืนแสง ครั้งที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร (ครั้งที่ 2)	ค่าการดูดกลืนแสง ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร (เฉลี่ย)
0	0	0	$0 \pm 0.00$
200	0.230	0.240	$0.138 \pm 0.00$
400	0.424	0.420	$0.325 \pm 0.00$
600	0.564	0.584	$0.477 \pm 0.01$
800	0.641	0.678	$0.562 \pm 0.02$
1000	0.859	0.832	$0.748 \pm 0.01$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน  
กลูโคสและค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร



รูปที่ ค1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกลูโคสและค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

ตารางที่ ค2 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ของชุดตัวอย่างเฮนไซม์

จำนวนเท่าที่เจือจางเฮนไซม์ (เท่า)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร (ครั้งที่ 1)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร (ครั้งที่ 2)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร (ครั้งที่ 3)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร (เฉลี่ย)
10	1.236	1.118	1.178	1.177 ± 0.05
100	0.527	0.472	0.594	0.531 ± 0.06
1000	0.368	0.285	0.390	0.347 ± 0.05
10000	0.194	0.252	0.357	0.267 ± 0.08

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค3 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ของชุดควบคุม

จำนวนเท่าที่ เจือจางเอนไซม์ (เท่า)	ค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร (ครั้งที่ 1)	ค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร (ครั้งที่ 2)	ค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร (ครั้งที่ 3)	ค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร (เฉลี่ย)
10	0.553	0.557	0.561	0.557 ± 0.00
100	0.226	0.224	0.235	0.228 ± 0.00
1000	0.078	0.088	0.087	0.084 ± 0.00
10000	0.073	0.073	0.073	0.073 ± 0.00

การคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์ CMCase

จากกราฟมาตรฐานกลูโคส สมการคือ  $y = 0.0007x$

ค่าของน้ำตาลกลูโคสจากหลอดทดลองที่ทำการเจือจางเอนไซม์ 100 เท่า

ต้องการหาค่า  $x$  จาก  $x = \frac{y}{0.0007}$

คำนวณได้ดังนี้  $x = \left( \frac{0.531 - 0.228}{0.0007} \right)$

ปริมาณน้ำตาลกลูโคส = 432.86 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

กิจกรรมของเอนไซม์ (unit / ml) =  $\frac{\text{ไมโครกรัมของกลูโคส} \times \text{ความเจือจาง}}{\text{น้ำหนักโมเลกุลของกลูโคส} \left( \frac{\text{กรัม}}{\text{โมล}} \right) \times \text{เวลา (นาที)} \times \text{ปริมาณเอนไซม์ (มิลลิลิตร)}}$

ที่การเจือจาง 100 เท่า นำไปคำนวณตามสูตรได้ดังนี้

กิจกรรมของเอนไซม์ (ยูนิตต่อมิลลิลิตร) =  $\frac{432.86 \left( \frac{\text{ไมโครกรัม}}{\text{มิลลิลิตร}} \right) \times 100}{180.156 \left( \frac{\text{กรัม}}{\text{โมล}} \right) \times 10 \text{ (นาที)} \times 0.5 \text{ (มิลลิลิตร)}}$

กิจกรรมของเอนไซม์ CMCase = 48.05 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

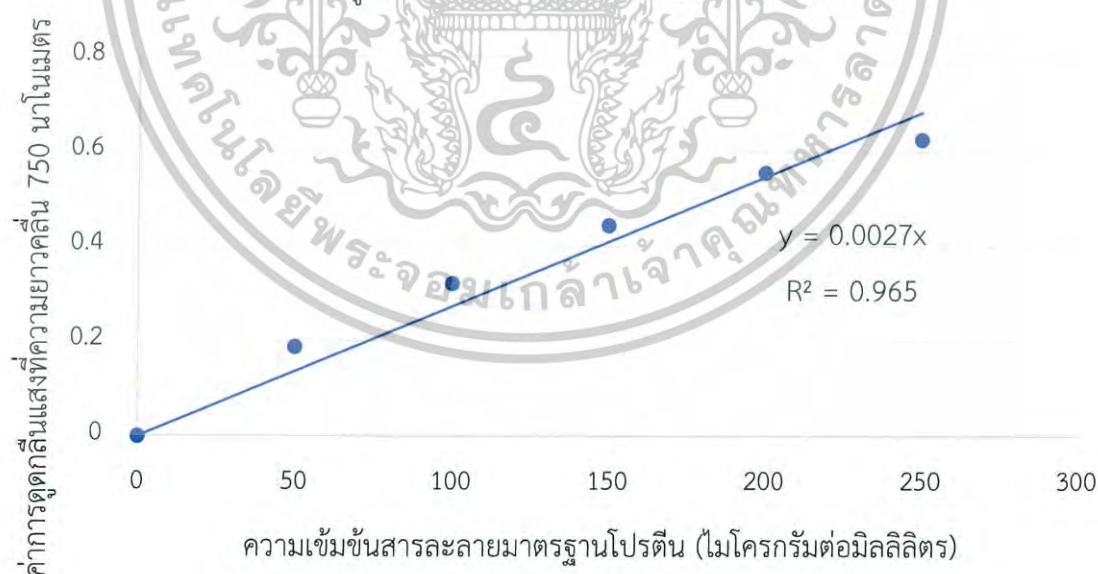
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ค2. การหาปริมาณโปรตีนในสารละลายเอนไซม์ CMCase

ตารางที่ ค4 ค่าการดูดกลืนคลื่นแสงของสารละลายมาตรฐานโปรตีนที่ความเข้มข้นต่างๆ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร

ความเข้มข้นสารละลายมาตรฐานโปรตีน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร (ครั้งที่ 1)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร (ครั้งที่ 2)	ค่าการดูดกลืนแสงความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร (เฉลี่ย)
0	0	0	$0 \pm 0.00$
50	0.281	0.282	$0.189 \pm 0.00$
100	0.416	0.414	$0.323 \pm 0.01$
150	0.537	0.538	$0.445 \pm 0.00$
200	0.652	0.645	$0.556 \pm 0.00$
250	0.731	0.707	$0.627 \pm 0.01$

กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานโปรตีนและค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร



รูปที่ ค2 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานโปรตีนและค่าการ

ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค5 ค่าการดูดกลืนแสงจากการวัดปริมาณโปรตีนในสารละลายเอนไซม์ Accellerase ที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร

จำนวนเท่าที่เจือจางของเอนไซม์ (เท่า)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร (ครั้งที่1)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร (ครั้งที่ 2)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร (เฉลี่ย)
10	4.000	4.000	4.000 ± 0.00
50	2.453	2.345	2.399 ± 0.07
100	1.613	1.609	1.611 ± 0.00
1000	0.344	0.345	0.344 ± 0.00

การคำนวณหาปริมาณโปรตีนในสารละลายเอนไซม์ CMCase

จากสมการ  $y = ax+b$

$$Y = 0.0027x$$

หาค่า  $x = \frac{y}{0.0027}$  โดยที่  $y =$  ค่าการดูดกลืนแสงของเอนไซม์ที่การเจือจางต่างๆ

ปริมาณโปรตีนที่การเจือจาง 1000x ( $y = 0.3445$ )

$$X = \frac{0.3445}{0.0025} = 137.8 \text{ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร}$$

คูณด้วยการเจือจาง  $X = 137.8 \times 1000 = 137,800$  ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

$$X = 137,800 \times 10^{-3} = 137.8 \text{ มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร}$$

กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ CMCase

$$\text{กิจกรรมจำเพาะ} = \frac{\text{กิจกรรมของเอนไซม์ (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)}}{\text{ปริมาณโปรตีน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)}}$$

$$= \frac{48.05 \text{ ยูนิตต่อมิลลิลิตร}}{137.8 \text{ มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร}}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีเมลที่ [office@scs.ac.th](mailto:office@scs.ac.th) ขอโทษและต้องอภัยถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### ค3. การคำนวณหาปริมาณแคลเซียมมาเลตจากการไทเทรตด้วยสารละลาย Ethylene Diamine Tetraacetic Acid (EDTA) ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ (FAO, 2006)

EDTA 1 มิลลิลิตร = แคลเซียมมาเลต 8.607 มิลลิกรัม

คำนวณหาปริมาณแคลเซียมมาเลตได้จาก

$$\frac{\text{น้ำหนักตะกอนทั้งหมด} \times \text{ปริมาณ EDTA ที่ใช้ไป} \times 0.008607}{\text{น้ำหนักตะกอนที่ใช้ไทเทรต}} \quad (\text{กรัม})$$

ตัวอย่าง

ปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ 25 มิลลิลิตร สามารถตกตะกอนแคลเซียมมาเลตได้ทั้งหมด 1.371 กรัม และชั่งน้ำหนักตะกอนมาใช้ในการไทเทรต 0.2061 กรัม ซึ่งใช้ปริมาณ EDTA ไป 9.5 มิลลิลิตร จึงจะถึงจุดยุติ

$$\begin{aligned} \text{คำนวณได้ดังนี้} &= \frac{\text{น้ำหนักตะกอนทั้งหมด} \times \text{ปริมาณ EDTA ที่ใช้ไป} \times 0.008607}{\text{น้ำหนักตะกอนที่ใช้ไทเทรต}} \\ &= \frac{1.371 \times 9.5 \times 0.008607}{0.2061} \\ &= 0.5439 \text{ กรัม} \end{aligned}$$

ในปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ 25 มิลลิลิตร มีแคลเซียมมาเลตอยู่ 0.5439 กรัม

ถ้าในปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ 1000 มิลลิลิตร จะมีแคลเซียมมาเลตอยู่  $\frac{0.5439 \times 1000}{25} = 21.75$  กรัม

ดังนั้นจะมีปริมาณแคลเซียมมาเลตอยู่ 21.756 กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้