การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมบางประการต่อการผลิตกรดมาลิค โดยแบคทีเรียที่คัดแยกได้

SOME OPTIMAL CONDITIONS FOR PRODUCTION OF MALIC ACID FROM ISOLATED BACTERIA

ชญานี มูลมงคล
ดลยา มาตรแม้น
ดลลญา เหมือนเปลื้อง

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2559

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมบางประการต่อการผลิตกรดมาลิค โดยแบคทีเรียที่คัดแยกได้

SOME OPTIMAL CONDITIONS FOR PRODUCTION OF MALIC ACID FROM ISOLATED BACTERIA

ชญานี มูลมงคล

ดลยา มาตรแม้น

ดลลญา เหมือนเปลื้อง

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2559

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

SOME OPTIMAL CONDITIONS FOR PRODUCTION OF MALIC ACID FROM ISOLATED BACTERIA

CHAYANEE MOONMONGKOL
DONLAYA MARTMAN
DONLAYA MUANPLEUNG

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENT FOR
THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE (INDUSTRIAL MICROBIOLOGY)
DEPARTMENT APPLIED OF BIOLOGY, FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
ACADEMIC YEAR 2016

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมบางประการต่อการผลิตกรดมาลิคโดยแบคทีเรียที่คัดแยกได้ Some optimal conditions for production of malic acid from isolated bacteria
ชื่อนักศึกษา	นางสาวชญานี มูลมงคล รหัสนักศึกษา 56050972 นางสาวดลยา มาตรแม้น รหัสนักศึกษา 56050994 นางสาวดลลญา เหมือนเปลื้อง รหัสนักศึกษา 56050995
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชา	ชีววิทยา
ปีการศึกษา	2559
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร. สมพิศ สอนโยธา

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม) ประจำปีการศึกษา 2559

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

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมบางประการต่อการผลิตกรดมาลิคโดยแบคทีเรียที่คัดแยกได้

ชื่อนักศึกษา นางสาวชญานี มูลมงคล รหัสนักศึกษา 56050972
นางสาวดลยา มาตรแม้น รหัสนักศึกษา 56050994
นางสาวดลลญา เหมือนเปลื้อง รหัสนักศึกษา 56050995

ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)

ภาควิชา ชีววิทยา

คณะ วิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)

ปีการศึกษา 2559

อาจารย์ที่ปรึกษา ดร. สมพิศ สอนโยธา

บทคัดย่อ

โครงงานพิเศษนี้มีวัตถุเพื่อศึกษาชนิดของอาหาร อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน และชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดมาลิคที่อยู่ในรูปแคลเซียมมาเลตโดยไอโซเลต DG2 ซึ่งคัดแยกได้จากองุ่น และไอโซเลต FX1 ซึ่งคัดแยกได้จากบ่อบำบัดน้ำเสียสภาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง พบว่าไอโซเลต DG2 สามารถผลิตแคลเซียมมาเลตผลได้สูงสุด 0.63±0.00 โมลต่อโมล เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร Basic medium นอกจากนี้จากการศึกษาอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตแคลเซียมมาเลต พบว่าไอโซเลต DG2 ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ และจากการศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนเหมาะสมต่อการผลิตแคลเซียมมาเลต พบว่าไอโซเลต DG2 สามารถผลิตแคลเซียมมาเลตผลได้สูงสุด 1.31±0.00 โมลต่อโมล เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร Basic medium ที่ใช้กากน้ำตาลที่ผ่านการกำจัดพิษแล้วเป็นแหล่งคาร์บอน สำหรับไอโซเลต FX1 พบว่าสามารถผลิตแคลเซียมมาเลตผลได้สูงสุด 0.50±0.01 โมลต่อโมล เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร Calcium malate production นอกจากนี้จากการศึกษาอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตแคลเซียมมาเลต พบว่าไอโซเลต FX1 สามารถผลิตแคลเซียมมาเลตผลได้สูงสุด 0.67±0.02 โมลต่อโมล เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร Calcium malate production ที่ใช้อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 100:1 จากการศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนเหมาะสมต่อการผลิตแคลเซียมมาเลต พบว่าไอโซเลต FX1 สามารถผลิตแคลเซียมมาเลตผลได้สูงสุด 0.73±0.00 โมลต่อโมล เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร Calcium malate production ที่ใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน จากการศึกษาครั้งนี้ ไอโซเลต DG2 และ FX1 สามารถผลิตกรดมาลิคในรูปแคลเซียมมาเลตโดยใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งกากน้ำตาลเป็นผลพลอยได้ราคาถูกจากอุตสาหกรรมทางการเกษตร ดังนั้นจึงเป็นวัตถุดิบที่ดี และเหมาะสำหรับนำมาผลิตกรดมาลิคในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

คำสำคัญ : กรดมาลิค แคลเซียมมาเลต สูตรอาหาร อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน แหล่งคาร์บอน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Some optimal conditions for production of malic acid from isolate bacteria
Students	Miss Chayanee Moonmongkol Student ID 56050972
	Miss Donlaya Martman Student ID 56050994
	Miss Donlaya Muanpleung Student ID 56050995
Degree	Bachelor of Science (Industrial Microbiology)
Department	Biology
Faculty	Science
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)
Academic Year	2016
Advisor	Dr. Somphit Sornyotha

Abstract

This special project was studied on the influence of different culture medium, the influence of different C:N ratio and the influence of different carbon sources to malic acid production in calcium malate form by isolate DG2 which isolated from grape and isolate FX1 which isolated from waste water treatment, King Mongkut's Institute of Latkrabang. The results shown that the isolate DG2 was produced the highest yield of calcium malate at 0.63±0.00 mol/mol, when grown in basic medium using glucose as a carbon source. Whereas a yield of calcium malate was not significantly altered when the influence of different C:N ratio in glucose cultivations were tested. The influence of different carbon sources to malic acid production were studied. The results shown that the isolate DG2 was produced the highest yield of calcium malate at 1.31±0.00 mol/mol, when grown in basic medium using pretreated molasses as a carbon source. While the isolate FX1 was produce the highest yield of calcium malate at 0.50±0.01 mol/mol, when grown in calcium malate production using xylose as a carbon source. Furtermore, the isolate FX1 was produce the highest yield of calcium malate at 0.67±0.02 mol/mol, when grown in calcium malate production using xylose as a carbon source at a C:N ratio of 100:1. The isolate FX1 was produce the highest yield of calcium malate at 0.73±0.00 mol/mol, when grown in calcium malate production using molasses as a carbon source. In this study, malic acid in calcium malate form can be produced from molasses by the isolates DG2 and FX1. The molasses are a low-value by products from sugar manufacturing. Based on these results, molasses is a good and cheap raw material for malic acid production and could be applied for industrial production of bio-based malic acid.

Keywords : Malic acid, Calcium malate, Culture medium, C:N ratio, Carbon source

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษนี้ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี เนื่องจากคณะผู้จัดทำได้รับความกรุณา และความช่วยเหลือจากบุคคลผู้มีพระคุณหลายท่าน ดังนี้

ขอขอบพระคุณ ดร.สมพิศ สอนโยธา อาจารย์ประจำภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษ ที่ได้ให้คำแนะนำ และข้อคิดเห็นอันเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการทำโครงงานพิเศษนี้ อีกทั้งยังช่วยเสนอแนะแนวทางการแก้ไขปัญหาต่างๆ ที่เกิดขึ้นระหว่างการดำเนินงาน ตลอดจนการตรวจแก้โครงงานพิเศษฉบับนี้ให้มีความถูกต้อง และความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร. ดวงกมล เรือนงาม และอาจารย์ ธนาวดี ก่ออานันต์ อาจารย์ประจำภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ได้ให้คำปรึกษา และชี้แนะแนวทางการแก้ไขปัญหาจนทำโครงงานพิเศษฉบับนี้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการวิทยาศาสตร์ เจ้าหน้าที่ห้องธุรการ เจ้าหน้าที่ฝ่ายอาคารสถานที่ คณะวิทยาศาสตร์ ตลอดจนแม่บ้านประจำตึกทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือ และอำนวยความสะดวกในการทำโครงงานพิเศษฉบับนี้จนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ บิดา มารดาซึ่งเปิดโอกาสให้ได้รับการศึกษาเล่าเรียน ตลอดจนคอยช่วยเหลือ และให้กำลังใจคณะผู้จัดทำเสมอมา

นอกจากนี้ขอขอบคุณ เพื่อนๆ พี่ๆ และน้องๆ ทุกคน ที่คอยเป็นกำลังใจให้ตลอดระยะเวลาการจัดทำโครงงานพิเศษนี้

สุดท้ายนี้คณะผู้จัดทำหวังเป็นอย่างยิ่งว่าโครงงานพิเศษฉบับนี้ จะเป็นประโยชน์สำหรับผู้ที่สนใจศึกษาข้อมูลที่เกี่ยวข้องทางด้านนี้ หากโครงงานพิเศษนี้มีข้อผิดพลาดประการใด ทางคณะผู้จัดทำขออภัยมา ณ โอกาสนี้ด้วย

ชญานี มูลมงคล
ดลยา มาตรแม้น
ดลลญา เหมือนเปลื้อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ช
สารบัญรูป	ซ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	3
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
2.1 กรดมาลิค	4
2.2 คุณสมบัติของกรดมาลิค	5
2.3 กระบวนการผลิตกรดมาลิค	6
2.3.1 กระบวนการผลิตทางเคมี	6
2.3.2 กระบวนการผลิตทางชีวภาพ	7
2.3.2.1 กระบวนการผลิตกรดมาลิคโดยแบคทีเรีย	10
2.3.2.2 กระบวนการผลิตกรดมาลิคโดยยีสต์	12
2.3.2.3 กระบวนการผลิตกรดมาลิคโดยเชื้อรา	15
2.4 แหล่งคาร์บอนที่ใช้ในกระบวนการสังเคราะห์กรดมาลิค	17
2.5 สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดมาลิค	21
2.6 ข้อดีและข้อเสียของการผลิตกรดมาลิคด้วยกระบวนการทางเคมีและทางชีวภาพ	24
2.6.1 ข้อดีและข้อเสียในการผลิตกรดมาลิคด้วยกระบวนการทางเคมี	24
2.6.2 ข้อดีและข้อเสียในการผลิตกรดมาลิคด้วยกระบวนการทางชีวภาพ	25
2.7 กระบวนการแยกกรดมาลิคให้บริสุทธิ์	27
2.8 ประโยชน์ของกรดมาลิค	27
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	29
3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์	29
3.2 สารเคมี	30
3.3 วิธีดำเนินงานวิจัย	32
3.3.1 แบคทีเรียที่ถูกคัดเลือกมาใช้ในการศึกษาการผลิตกรดมาลิคโดยใช้ไซโลสและกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน	32
3.3.2 อาหารสำหรับใช้ศึกษาการผลิตกรดมาลิคโดยไอโซเลต DG2 และ FX1	32
3.3.2.1 อาหารเหลว Basic medium	32

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หน้า

3.3.2.2 อาหารเหลว Calcium malate production..... 32
3.3.2.3 อาหารเหลว Main culture..... 33
3.3.2.4 อาหารเหลว Production medium..... 33
3.3.2.5 อาหารเหลว Shaker culture..... 33
3.3.3 การเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้น..... 34
3.3.4 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมบางประการต่อการผลิตกรดมาลิค.....34
3.3.4.1 ผลของชนิดอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดมาลิค..... 34
3.3.4.2 ผลของอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อ การผลิตกรดมาลิค..... 34
3.3.4.3 ผลของชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดมาลิค.... 35
3.3.5 การตรวจสอบหาปริมาณน้ำตาล..... 35
3.3.5.1 การตรวจสอบหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS 35
3.3.5.2 การตรวจสอบหาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธีฟีนอลซัลฟิวริค..... 36
3.3.6 การตรวจสอบหาปริมาณแคลเซียมมาเลต..... 37
3.3.6.1 การตกตะกอนแคลเซียมมาเลตด้วยเมทานอล..... 37
3.3.6.2 การหาปริมาณแคลเซียมมาเลตด้วยวิธีการไทเทรต..... 37
3.3.7 การกำจัดสารพิษออกจากกากน้ำตาล..... 37
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล..... 38
4.1 การศึกษาผลของชนิดอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดมาลิค 38
4.1.1 การศึกษาผลของชนิดอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดมาลิคของ ไอโซเลต DG2 38
4.1.2 การศึกษาผลของชนิดอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดมาลิคของ ไอโซเลต FX1..... 42
4.2 การศึกษาผลของอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิต กรดมาลิค..... 46
4.2.1 การศึกษาผลของอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อ การผลิตกรดมาลิคของไอโซเลต DG2..... 46
4.2.2 การศึกษาผลของอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อ การผลิตกรดมาลิคของไอโซเลต FX1..... 50
4.3 การศึกษาผลของชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดมาลิค..... 54
4.3.1 การศึกษาผลของชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดมาลิค ของไอโซเลต DG2..... 54
4.3.2 การศึกษาผลของชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดมาลิค ของไอโซเลต FX1..... 58
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ..... .62
5.1 สรุปผลการวิจัย 62
5.2 ข้อเสนอแนะ..... 62

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หน้า

เอกสารอ้างอิง 63
ภาคผนวก..... 72
ภาคผนวก ก..... 73
ภาคผนวก ข..... 75

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

1.1 สารเคมี 12 รายการที่ถือเป็น Building block ในการพัฒนาเป็นสารเคมีที่มีมูลค่าเพิ่ม..... 1
2.1 คุณสมบัติทางกายภาพของกรดคาร์บอกซิลิค..... 5
2.2 จุลินทรีย์สายพันธุ์ต่างๆที่สามารถผลิตโพลีมาลิค (PMA) และกรดมาลิค (Malic acid)..... 9
2.3 แสดงปริมาณกรดมาลิค และผลได้ที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ต่างๆ..... 14
2.4 การผลิตกรดโพลีมาลิคและกรดมาลิคจากแหล่งคาร์บอนต่างๆโดยเชื้อรา *Aureobasidium pullulans*..... 18
2.5 ปริมาณกรดมาลิคที่ผลิตได้โดยเชื้อรา *A. pullulans* สายพันธุ์ต่างๆ..... 18
2.6 การผลิตกรดโพลี-เบต้า-แอลมาลิค (poly-β-L-malic acid) (PMA) ด้วยวัตถุดิบทางเกษตรโดย *Aureobasidium pullulans* สายพันธุ์ต่างๆ..... 20
2.7 การผลิตกรดมาลิคโดย *Aspergillus flavus* เมื่อเพาะเลี้ยงในอัตราการปั่นกวนที่แตกต่าง.....21
2.8 การผลิตกรดมาลิคโดย *Aspergillus flavus* เมื่อใช้ความเข้มข้นของไนโตรเจนเริ่มต้นต่างกัน..... 22
2.9 การผลิตกรดมาลิค โดย *Aspergillus flavus* เมื่อใช้ความเข้มข้นของโลหะไอออนแตกต่างกัน..... 23
2.10 ของเสียและวัสดุเหลือใช้ที่ได้จากแหล่งผลิตต่างๆ..... 26
4.1 แสดงปริมาณแคลเซียมมาเลต ผลได้ และพีเอชจากการเพาะเลี้ยงไอโซเลต DG2 ในสูตรอาหารที่แตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 5 วัน..... 39
4.2 แสดงปริมาณแคลเซียมมาเลต ผลได้ และพีเอชจากการเพาะเลี้ยงไอโซเลต FX1 ในสูตรอาหารที่อาหารแตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 6 วัน..... 42
4.3 แสดงปริมาณแคลเซียมมาเลต ผลได้ และค่าพีเอชจากการเพาะเลี้ยงไอโซเลต DG2 ในอาหาร Basic medium ที่อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนแตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 5 วัน 46
4.4 แสดงปริมาณแคลเซียมมาเลต ผลได้ และค่าพีเอชเมื่อเพาะเลี้ยงไอโซเลต FX1 ในอาหาร Calcium malate production ที่มีอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนแตกต่างกันเป็นระยะเวลา 6 วัน..... 50
4.5 แสดงปริมาณแคลเซียมมาเลต ผลได้ ปริมาณแหล่งคาร์บอนเริ่มต้น ปริมาณแหล่งคาร์บอนที่เหลือ และค่าพีเอช เมื่อเพาะเลี้ยงไอโซเลต DG2 ในอาหาร Basic medium ที่มีแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆเป็นระยะเวลา 5 วัน..... 55
4.6 แสดงปริมาณแคลเซียมมาเลต ผลได้ ปริมาณแหล่งคาร์บอนเริ่มต้น ปริมาณแหล่งคาร์บอนที่เหลือ และค่าพีเอช เมื่อเพาะเลี้ยงไอโซเลต FX1 ในอาหาร Calcium malate production ที่มีแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ เป็นระยะเวลา 6 วัน..... 59

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่ **หน้า**

2.1 โครงสร้างของกรดมาลิค 4
2.2 การใช้เอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา..... 4
2.3 การผลิตกรดมาลิคด้วยปฏิกิริยาไฮเดรชั่น (Hydration) ของกรดมาเลอิคภายใต้อุณหภูมิและความดันสูง..... 6
2.4 การผลิตกรดมาลิคด้วยปฏิกิริยาไฮเดรชั่นของกรดฟูมาริคที่อุณหภูมิ 286 องศาเซลเซียส... 6
2.5 วัฏจักรกรดไตรคาร์บอกซิลิค (Tricarboxylic acid cycle)..... 8
2.6 วิถีเมตาบอลิกของเชื้อ *E. coli* เมื่อ *aceE/F* คือ Pyruvate dehydrogenase multien-zyme conmplex, *acnA/B คือ* Aconitase, *adhE/C* คือ Alcohol dehydrogenase, *fumA/B/C* คือ Fumarase, *gltA* คือ Citrate synthase, *icdA* คือ Isocitrate dehydrogenase, *ldhA* คือ D-lactate dehydrogenase, *mdh* คือ Malate dehydrogenase, *pckA* คือ Phosphoenolpyruvate carboxykinase, *ppc* คือ Phosphoenolpyruvate carboxylase, *pta/ackA* คือ phosphate acetyltransferase/Acetate kinase, *ptsG* คือ Phosphotransferase system enzyme, *pykA* คือ Pyruvate kinase, *sfcA* คือ Malic enzyme, , *sdhA/B/C/D* คือ Succinate dehydrogenase, *sucA/B-lpdA* คือ α-ketoglutarate dehydrogenase complex, *sucC/D* คือ Succinyl-CoA synthetase..... 11
2.7 การผลิตกรดมาลิคในวัฏจักรกรดไตรคาร์บอกซิลิค (Tricarboxylic acid cycle)..... 13
2.8 การเมตาบอไลท์ของน้ำตาล และการสังเคราะห์กรดโพลีมาลิคด้วยเชื้อ *Aureobasidium pullulans*..... 16
2.9 เชื้อรา *Aureobasidium pullulans* ที่มีความสามารถในการผลิตกรดมาลิค..... 16
2.10 กระบวนการเปลี่ยนน้ำตาลไซโลสเป็นไซลูโลสของเชื้อจุลินทรีย์..... 18
2.11 พลังงานและผลิตภัณฑ์มูลค่าเพิ่ม (Value-added products) ที่ผลิตได้จากชีวมวลที่มีเซลลูโลสสูง, SSF คือ simultaneous fermentation and saccharification, VFAs คือ volatile fatty acids 24
4.1 แสดงปริมาณน้ำตาลที่เหลือ (A) และพีเอช (B) ของไอโซเลต DG2 ณ เวลาต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร Basic medium, Calcium malate production, Main culture, Production medium, และ Shaker culture 40
4.2 แสดงปริมาณแคลเซียมมาเลตที่ผลิตได้ และร้อยละผลได้ของไอโซเลต DG2 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรต่างๆ เป็นระยะเวลา 5 วัน โดย ■ คือปริมาณแคลเซียมมาเลตที่ผลิตได้ และ ▨ คือผลได้..... 41
4.3 แสดงปริมาณน้ำตาลที่เหลือ (A) และพีเอช (B) ของไอโซเลต FX1 ณ เวลาต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร Basic medium, Calcium malate production, Main culture, Production medium, และ Shaker culture..... 43

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หน้า

4.4 แสดงปริมาณแคลเซียมมาเลตที่ผลิตได้ และผลได้ของไอโซเลต FX1 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรต่างๆ เป็นระยะเวลา 6 วัน โดย ■ คือปริมาณแคลเซียมมาเลตที่ผลิตได้ และ ▨ คือผลได้ 45
4.5 แสดงปริมาณน้ำตาลที่เหลือ และค่าพีเอชของไอโซเลต DG2 ณ เวลาต่างๆ โดยเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร Basic medium ที่มีอัตราส่วนระหว่างแหล่งคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่างๆ คือ 50:1, 75:1, 100:1, 125:1, 150:1 และ 200:1 ตามลำดับ..... 47
4.6 แสดงปริมาณแคลเซียมมาเลตที่ผลิตได้ และผลได้ของไอโซเลต DG2 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร Basic medium ที่มีอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนแตกต่างกันเป็นระยะเวลา 5 วัน โดย ■ คือปริมาณแคลเซียมมาเลตที่ผลิตได้ และ ▨ คือผลได้..... 49
4.7 แสดงปริมาณน้ำตาลที่เหลือ และค่าพีเอชของไอโซเลต FX1 ณ เวลาต่างๆ โดยเพาะเลี้ยงในอาหาร Calcium malate production ที่มีอัตราส่วนระหว่างแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนต่างๆ คือ 10:1, 20:1, 30:1, 40:1, 50:1 และ 100:1 ตามลำดับ..... 51
4.8 แสดงปริมาณของแคลเซียมมาเลตที่ผลิตได้ และผลได้ของไอโซเลต FX1 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร Calcium malate production ที่มีอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนแตกต่างกันเป็นระยะเวลา 6 วัน โดย ■ คือปริมาณแคลเซียมมาเลตที่ผลิตได้ และ ▨ คือผลได้..... 53
4.9 แสดงปริมาณของแคลเซียมมาเลตที่ผลิตได้ และผลได้ของไอโซเลต DG2 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร Basic medium ที่มีชนิดของแหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 5 วัน โดย ■ คือปริมาณแคลเซียมมาเลตที่ผลิตได้ และ ▨ คือผลได้..... 57
4.10 แสดงปริมาณของแคลเซียมมาเลตที่ผลิตได้ และผลได้ของไอโซเลต FX1 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร Calcium malate production ที่มีชนิดของแหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 6 วัน โดย ■ คือปริมาณแคลเซียมมาเลตที่ผลิตได้ และ ▨ คือผลได้..... 61

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

กรดมาลิค เป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอนประเภทคาร์บอกซิลิคที่มีหมู่คาร์บอกซิล 2 หมู่ เชื่อมต่อกับคาร์บอน 4 อะตอม มีลักษณะเป็นผลึกสีขาวขนาดเล็ก สามารถละลายได้ในน้ำ และมีรสชาติที่เป็นเอกลักษณ์ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับรสเปรี้ยวในผลไม้ชนิดต่างๆ เป็นสารประกอบที่สามารถพบได้ทั่วไปในวัตถุดิบตามธรรมชาติ เช่น แอปเปิ้ล เชอรี่ พลัม และมะเขือเทศ เป็นต้น โดย Carl Wilhelm Scheele ได้ค้นพบกรดมาลิคเป็นครั้งแรกในปี ค.ศ. 1785 จากน้ำแอปเปิ้ลแต่พบในปริมาณน้อย ด้วยความเป็นเอกลักษณ์ของกรดมาลิคนี้จึงได้รับความสนใจและใช้อย่างแพร่หลายในด้านอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น ใช้เป็นสารเติมแต่งในอุตสาหกรรมอาหาร และเครื่องดื่ม อุตสาหกรรมยา ตลอดจนใช้เป็นสารชะล้างโลหะและใช้ในการผลิตพลาสติกต่างๆ เป็นต้น (Goldberg และคณะ, 2006) ดังนั้นกรดมาลิคจึงถูกจัดให้เป็น 1 ใน 12 สารที่ถือเป็น Building block ในการพัฒนาเป็นสารเคมีที่มีมูลค่าเพิ่มแสดงดังตารางที่ 1.1 (Werpy และ Petersen, 2004)

ตารางที่ 1.1 สารเคมี 12 รายการที่ถือเป็น Building block ในการพัฒนาเป็นสารเคมีที่มีมูลค่าเพิ่ม

Building blocks
กรดซัคซินิค, กรดฟูมาริค และกรดมาลิค (1,4 succinic, fumaric and malic acids)
กรดฟูแรน ไดคาร์บอกซิลิค (2,5 furan dicarboxylic acid)
กรดไฮดรอกซี โพรพิโอนิค (3 hydroxy propionic acid)
กรดแอสพาติค (Aspartic acid)
กรดกลูคาริค (Glucaric acid)
กรดกลูตามิค (Glutamic acid)
กรดอิทาโคนิค (Itaconic acid)
กรดเลวูลินิค (levulinic acid)
ไฮดรอกซีบิวธิโลแลคโทน (3-hydroxybutyrolactone)
กลีเซอรอล (Glycerol)
ซอร์บิทอล (Sorbital)
ไซลิทอล และ อะราบินิทอล (Xylitol/arabinitol)

ที่มา : Werpy และ Petersen (2004)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การผลิตกรดอินทรีย์ต่างๆ ในเชิงพาณิชย์ ต้นทุนการผลิต ถือเป็นปัจจัยหลักที่ควรคำนึง หากต้นทุนการผลิตสูงย่อมไม่คุ้มค่าในการผลิต ดังนั้นการเลือกวิธีการผลิตจึงเป็นสิ่งสำคัญที่ไม่อาจมองข้ามได้ (Mondala, 2015) ปัจจุบันการผลิตกรดมาลิคแบ่งออกได้ 2 แบบ คือ การสังเคราะห์กรดมาลิคโดยวิธีทางเคมี เช่น การสกัดกรดมาลิคจากน้ำแอปเปิ้ล วิธีการนี้ไม่นิยมใช้เพราะมีข้อเสียคือ ปริมาณกรดมาลิคที่ผลิตได้ค่อนข้างน้อย คุณภาพของกรดที่ผลิตได้ค่อนข้างต่ำ จึงหันมาสังเคราะห์กรดมาลิคด้วยการทำปฏิกิริยาไฮเดรชั่น (Hydration) ของกรดฟูมาริคและกรดมาเลอิค ที่สภาวะความดันและอุณหภูมิสูง (Hronska และคณะ, 2015) แต่ก็ยังไม่สามารถแก้ไขปัญหาด้านต้นทุนในการผลิต และผลิตภัณฑ์ที่ผลิตได้ ซึ่งกรดมาลิคที่ผลิตได้จากปฏิกิริยาไฮเดรชั่น (Hydration) จะได้ผลิตภัณฑ์ทั้งในรูปแบบ D–form และ L-form จึงมีการพัฒนาวิธีการผลิตกรดมาลิคด้วยวิธีทางชีวภาพเพื่อทดแทนการผลิตกรดมาลิคด้วยวิธีทางเคมีเพื่อลดต้นทุนในการผลิตลง จากงานวิจัยการผลิตกรดมาลิคโดยใช้เชื้อรา *Aspergillus* spp. และ *Schizophyllum commune* จากเศษวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรให้ผลผลิตของกรดมาลิคค่อนข้างต่ำคือ 0.1-0.6 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และเชื้อรามีการสร้างเส้นใย เกิดการปนเปื้อนง่ายยากต่อการคัดแยกผลิตภัณฑ์ให้บริสุทธิ์ (Okamoto และคณะ, 2015) ดังนั้นจึงมีการพัฒนาประสิทธิภาพของระบบการผลิต เพื่อให้สามารถผลิตกรดมาลิคทางชีวภาพได้สูงขึ้น และส่งผลดีทางเศรษฐกิจต่อไป โดย Wang และคณะ (1998) ได้ทำการทดลองใช้เชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisisiae* ผลิตกรดมาลิคผ่านวัฏจักรกรดไตรคาร์บอกซิลิค โดยใช้กรดฟูมาริคเป็นแหล่งคาร์บอน และปริมาณกรดมาลิคที่ผลิตได้โดย *Saccharomyces cerevisisiae* คือ 0.55 กรัมต่อฟูมาริคหนึ่งกรัมต่อชั่วโมง (Wang และคณะ, 1998) อย่างไรก็ตามกรดฟูมาริคมีราคาค่อนข้างสูงจึงไม่นิยมใช้

จากการศึกษาก่อนหน้านี้ ได้ทำการคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดมาลิคได้โดยใช้น้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน ได้แก่ ไอโซเลต DG2 ซึ่งคัดแยกได้จากองุ่น และไอโซเลต FX1 คัดแยกได้จากบ่อบำบัดน้ำเสีย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (ประภัสสร เทพกัณฑ์ และสุพรรณิกา ยอดสง่า, 2557) และมีการศึกษาปริมาณแหล่งคาร์บอนและแคลเซียมคาร์บอเนตที่เหมาะสมเพื่อให้ผลิตกรดมาลิคได้ในปริมาณสูงขึ้น (พาณิภัค วารุณศาสตร์ และคณะ, 2558) ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงต้องการศึกษาเกี่ยวกับสภาวะที่เหมาะสมบางประการคือ ชนิดของอาหาร ชนิดของแหล่งคาร์บอน และอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C:N ratio) ที่มีผลต่อการผลิตกรดมาลิคโดยใช้แบคทีเรียที่คัดแยกได้ทั้ง 2 ไอโซเลตนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1) เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมบางประการในการผลิตกรดมาลิคด้วยแบคทีเรียไอโซเลต DG2 และ ไอโซเลต FX1 เช่น ชนิดของอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C:N ratio) และชนิดของแหล่งคาร์บอน เป็นต้น

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1) เพาะเลี้ยงหัวเชื้อแบคทีเรียเริ่มต้น ในอาหาร Selective medium เป็นเวลา 16-24 ชั่วโมง วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรให้อยู่ในช่วง 0.5-1 โดยใช้ไซโลสหรือกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน
2) ศึกษาผลของชนิดอาหาร 5 สูตร คือ อาหารเหลว Shaker culture (Tabushi และคณะ, 1981) อาหาร Main culture (Ochsenreither และคณะ, 2014) อาหาร Malate Production (Zhang และคณะ, 2011) อาหาร Basic medium (Li และคณะ, 2014) และอาหาร Calcium malate production (Khan และคณะ, 2014) ต่อการผลิตกรดมาลิคโดยไอโซเลต DG2 และ ไอโซเลต FX1
3) ศึกษาอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนและไนโตรเจนที่มีผลต่อการผลิตกรดมาลิคให้ได้ปริมาณสูงขึ้น
4) ตรวจสอบปริมาณแคลเซียมมาเลตด้วยวิธีการไทเทรต ตรวจสอบน้ำตาลที่เหลือด้วยวิธี DNS method ตรวจสอบน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธี Phenol–Sulfuric acid method และวัดค่าพีเอชด้วย pH meter

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

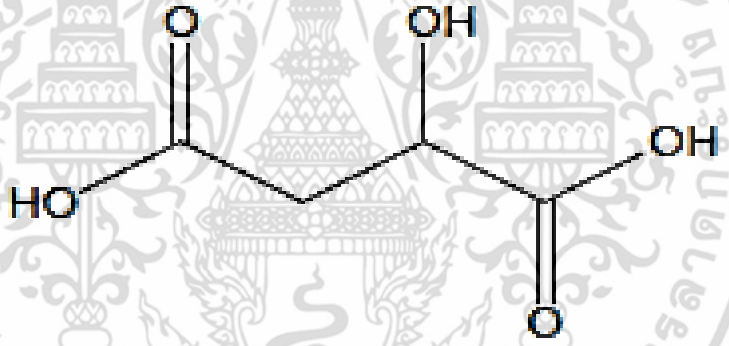
1) สามารถผลิตกรดมาลิคโดยไอโซเลต DG2 และ ไอโซเลต FX1 ได้ปริมาณสูงขึ้น
2) ทราบแนวทางในการผลิตกรดมาลิคในระดับใหญ่ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

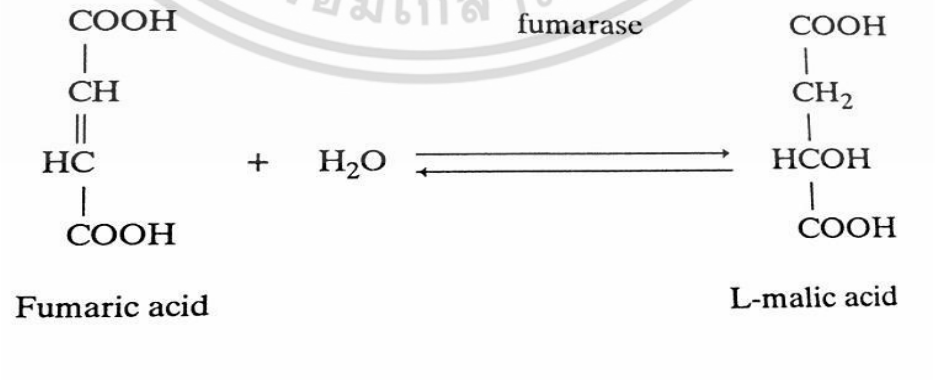
บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 กรดมาลิค

กรดมาลิค (Malic acid) หรือกรดแอปเปิ้ล (Apple acid) เป็นสารประกอบอินทรีย์มีสูตรโมเลกุลคือ $C_4H_6O_5$ ดังรูปที่ 2.1 มีชื่อทางเคมีว่า Hydroxybutaneoic acid หรือ Hydroxysuccinic acid (Theron และ Lues, 2010) เป็นกรดไดคาร์บอกซิลิคที่ผลิตได้จากสิ่งมีชีวิต พบได้ทั่วไปในผักและผลไม้ต่างๆ ส่งผลให้ผลไม้มีรสชาติเปรี้ยวที่เป็นเอกลักษณ์ เช่น แอปเปิ้ล เชอรี่ พลัม เป็นต้น (Fernandez และคณะ, 2010) และมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่อุณหภูมิสูงได้ดีกว่ากรดอะซิติคและกรดแลคติค (Doyle, 1999) และในทางอุตสาหกรรมยังใช้กรดมาลิคเป็นสารเติมแต่งในอาหาร ยา และ เครื่องสำอางอีกด้วย กรดมาลิคมี 2 รูปแบบ ได้แก่ L-form และ D- form ซึ่งมีเพียง L-form เท่านั้นที่พบได้ในธรรมชาติและนอกจากจะพบได้ทั่วไปตามธรรมชาติแล้ว เรายังสามารถผลิตกรดมาลิคได้จากการสังเคราะห์ทางเคมีและกระบวนการหมักทางชีวภาพหรือการใช้เอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา เช่น การใช้เอนไซม์ ฟูมาเลส (Fumarase) ดังรูปที่ 2.2



รูปที่ 2.1 โครงสร้างของกรดมาลิค
ที่มา : Fernandez และคณะ (2010)



รูปที่ 2.2 การใช้เอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา
ที่มา : Tanaka และคณะ (1993)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 คุณสมบัติของกรดมาลิค

กรดมาลิค มีลักษณะเป็นผงผลึกสีขาวหรือเป็นเม็ดเล็กๆ ไม่มีกลิ่น สามารถดูดความชื้นได้ดี แต่ปัญหาหลักของกรดมาลิค คือ น้ำระเหยออกง่ายจนแห้งเมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิสูงและหากมีความชื้นสูงจะทำให้เกิดการรวมตัวกันเป็นกลุ่มและเกิดบาวน์นิ่งได้ง่าย (ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสและความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 85) ดังนั้นจึงได้มีการเก็บรักษาโดยการนำกรดมาลิคเคลือบไว้ในแคปซูล ซึ่งกรดมาลิคที่เคลือบในแคปซูลสามารถช่วยลดการดูดความชื้นของกรด ลดฝุ่น และยังช่วยให้กรดมาลิคไม่รวมตัวกันเป็นกลุ่ม อีกทั้งยืดอายุการเก็บรักษาได้นานขึ้นอีกด้วย อย่างไรก็ตามปัจจุบันยังไม่มีสภาวะการเก็บรักษาที่เฉพาะ จึงจำเป็นที่จะต้องเก็บไว้ที่แห้งและป้องกันการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิและความชื้น (Goldberg และ Williams, 1991) โดยคุณสมบัติทางกายภาพของกรดคาร์บอกซิลิคต่างๆ แสดงดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 คุณสมบัติทางกายภาพของกรดคาร์บอกซิลิค

คุณสมบัติ	**กรดซิตริค**		**กรดฟูมาริค**	**กรดมาลิค**
	ไม่มีน้ำ	**มีน้ำ**		
สูตรโครงสร้าง	$C_6H_8O_7$	$C_6H_8O_7{\cdot}H_2O$	$C_4H_4O_4$	$C_4H_6O_5$
มวลโมเลกุล (ดาลตัน)	192.13	210.15	116.07	134.09
ความถ่วงจำเพาะ	1.665	1.542	1.635	1.601
จุดหลอมเหลว (องศาเซลเซียส)	153	135-152	286-287	128.5-129
พีเอชของสารละลายที่ 0.1 นอร์มอล	2.00	1.95	2.21	2.20
การละลายที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร)				
น้ำ	162	209	0.63	55.8 (20°C)
แอลกอฮอล์	59	90	4.3	39.16
เอสเธอร์	0.75	1.6	0.56	1.41

ที่มา : ดัดแปลงมาจาก Gardner (1966)

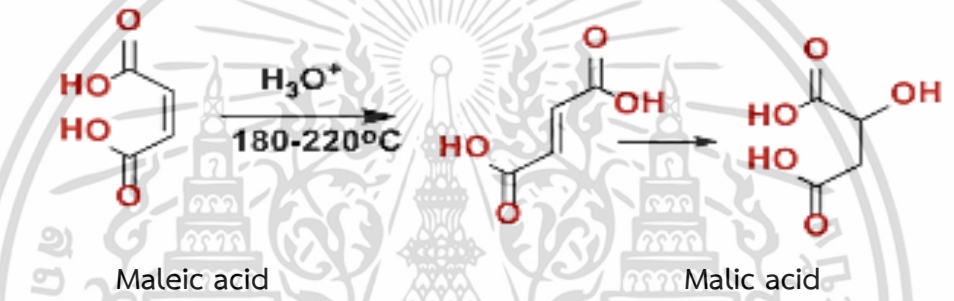
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 กระบวนการผลิตกรดมาลิค

ในปี ค.ศ. 1785 Carl Wilhelm Scheele ได้ค้นพบกรดมาลิคเป็นครั้งแรกจากน้ำแอปเปิ้ล แต่พบในปริมาณน้อย การสกัดกรดมาลิคจากน้ำแอปเปิ้ลจึงเป็นวิธีการที่ไม่นิยมใช้เพราะมีข้อเสียคือ ปริมาณกรดมาลิคที่ผลิตได้ค่อนข้างน้อย คุณภาพของกรดที่ผลิตได้ค่อนข้างต่ำ ดังนั้นจึงมีการพัฒนากระบวนการผลิตกรดมาลิคให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น

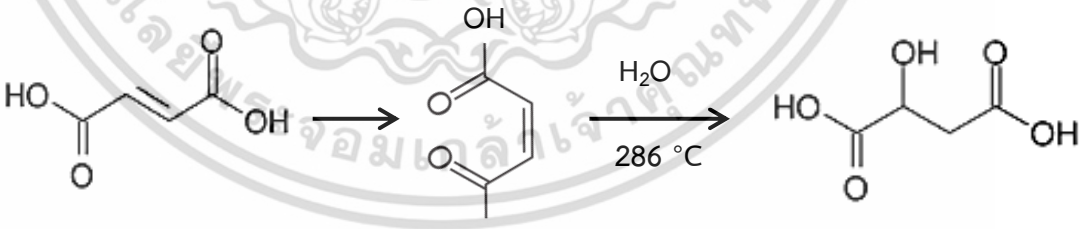
2.3.1 กระบวนการผลิตทางเคมี

กระบวนการผลิตกรดมาลิคในทางเคมี คือการทำปฏิกิริยาไฮเดรชั่น (Hydration) กรดฟูมาริค หรือกรดมาเลอิคที่ความดันและอุณหภูมิสูง โดยกรดฟูมาริคจะเปลี่ยนโครงสร้างเป็นกรดมาลิคโดยการเติมน้ำเข้าไปที่พันธะคู่ ดังรูปที่ 2.4 และ รูปที่ 2.5 ตามลำดับ ซึ่งผลิตภัณฑ์ที่ได้จะเป็นสารผสม (Racemic mixture) คือ D-form และ L-form (Hronska และคณะ, 2015) กระบวนการผลิตนี้มีราคาต้นทุนที่ค่อนข้างสูงจึงไม่นิยมใช้ในปัจจุบัน



Maleic acid Malic acid

รูปที่ 2.3 การผลิตกรดมาลิคด้วยปฏิกิริยาไฮเดรชั่น (Hydration) ของกรดมาเลอิคภายใต้อุณหภูมิและความดันสูง
ที่มา : Musa (2016)



Fumaric acid Maleic acid Malic acid

รูปที่ 2.4 การผลิตกรดมาลิคด้วยปฏิกิริยาไฮเดรชั่นของกรดฟูมาริคที่อุณหภูมิ 286 องศาเซลเซียส
ที่มา : March และ Brown (2017)

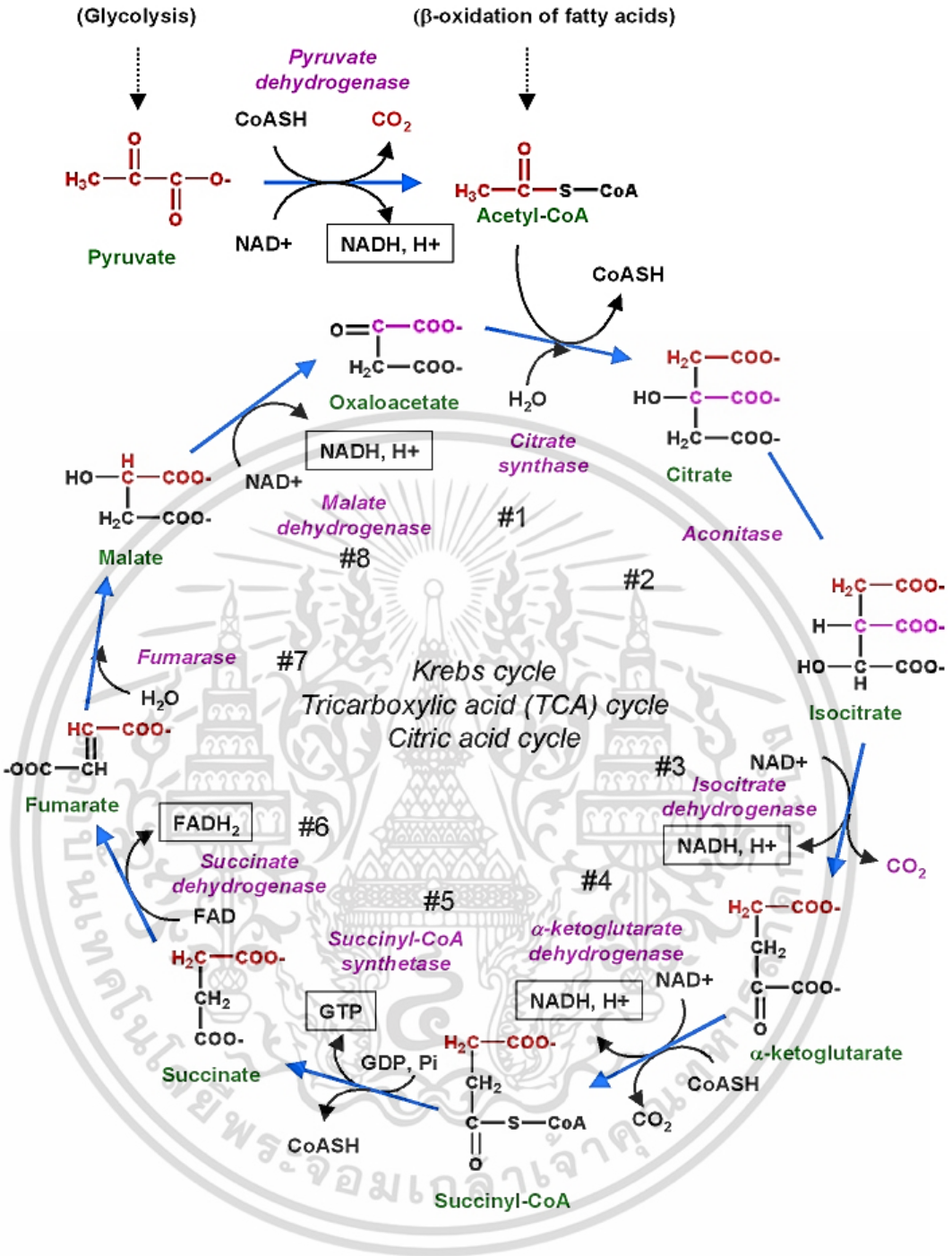
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.2 กระบวนการผลิตทางชีวภาพ

กระบวนการผลิตกรดมาลิคทางชีวภาพอาศัยความสามารถในการสังเคราะห์กรดมาลิค ผ่านวิถีเพนโตสฟอสเฟต (Pentose phosphate pathway) วิถีไกลโคไลซิส (Glycolysis) วัฏจักรกรดไตรคาร์บอกซิลิค (Krebs cycle or Tricarboxylic acid cycle) ของจุลินทรีย์ ดังรูปที่ 2.5 โดยวัตถุดิบที่ใช้เป็นสารตั้งต้นในกระบวนการหมักนั้น อาจจะใช้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว หรือวัตถุดิบทางชีวมวลซึ่งมีราคาต้นทุนค่อนข้างต่ำ หาได้ง่าย และมีปริมาณมาก อาทิ ผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร ซังข้าวโพด ฟางข้าว กากน้ำตาล และถั่วเหลือง เป็นต้น (Cheng และคณะ, 2017) ซึ่งผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการผลิตทางชีวภาพมีปริมาณค่อนข้างต่ำแต่จะผลิตกรดมาลิคในรูปของ L-form เท่านั้น ซึ่งกระบวนการผลิตทางเคมีไม่สามารถทำได้ ดังนั้นเมื่อเปรียบเทียบในเชิงพาณิชย์แล้ว การผลิตกรดมาลิคด้วยกระบวนการผลิตทางชีวภาพจะได้เปรียบมากกว่าการผลิตทางเคมี ทั้งในด้านราคาต้นทุนการผลิตที่น้อยกว่า และลดขั้นตอนการทำผลิตภัณฑ์ให้บริสุทธิ์ (Goldberg และคณะ, 2006)

ในปี ค.ศ. 2016 Zou และคณะ ได้ทำการศึกษาการผลิตกรดมาลิค (Poly-malic) โดยเชื้อรา *Aureobasidium pullulans* สายพันธุ์ YJ 6–11 โดยใช้แหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน คือ กลูโคส ซูโครส ไซโลส ฟรุกโทส และมอลโทส เลี้ยงที่สภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 220 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 4 วัน และใช้ $CaCO_3$ เป็นสารปรับความเป็นกลางของอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าสามารถผลิตกรดโพลีมาลิค (Polymalic) ได้สูงที่สุด คือ 28.30 ± 0.08 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน นอกจากนี้ยังมีจุลินทรีย์สายพันธุ์อื่นๆที่สามารถผลิตกรดมาลิคหรือกรดโพลีมาลิคได้ ดังตารางที่ 2.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.5 วัฏจักรกรดไตรคาร์บอกซิลิค (Tricarboxylic acid cycle)

ที่มา : Garrett และคณะ (2008)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.2 จุลินทรีย์สายพันธุ์ต่างๆที่สามารถผลิตโพลีมาลิค (PMA) และกรดมาลิค (Malic acid)

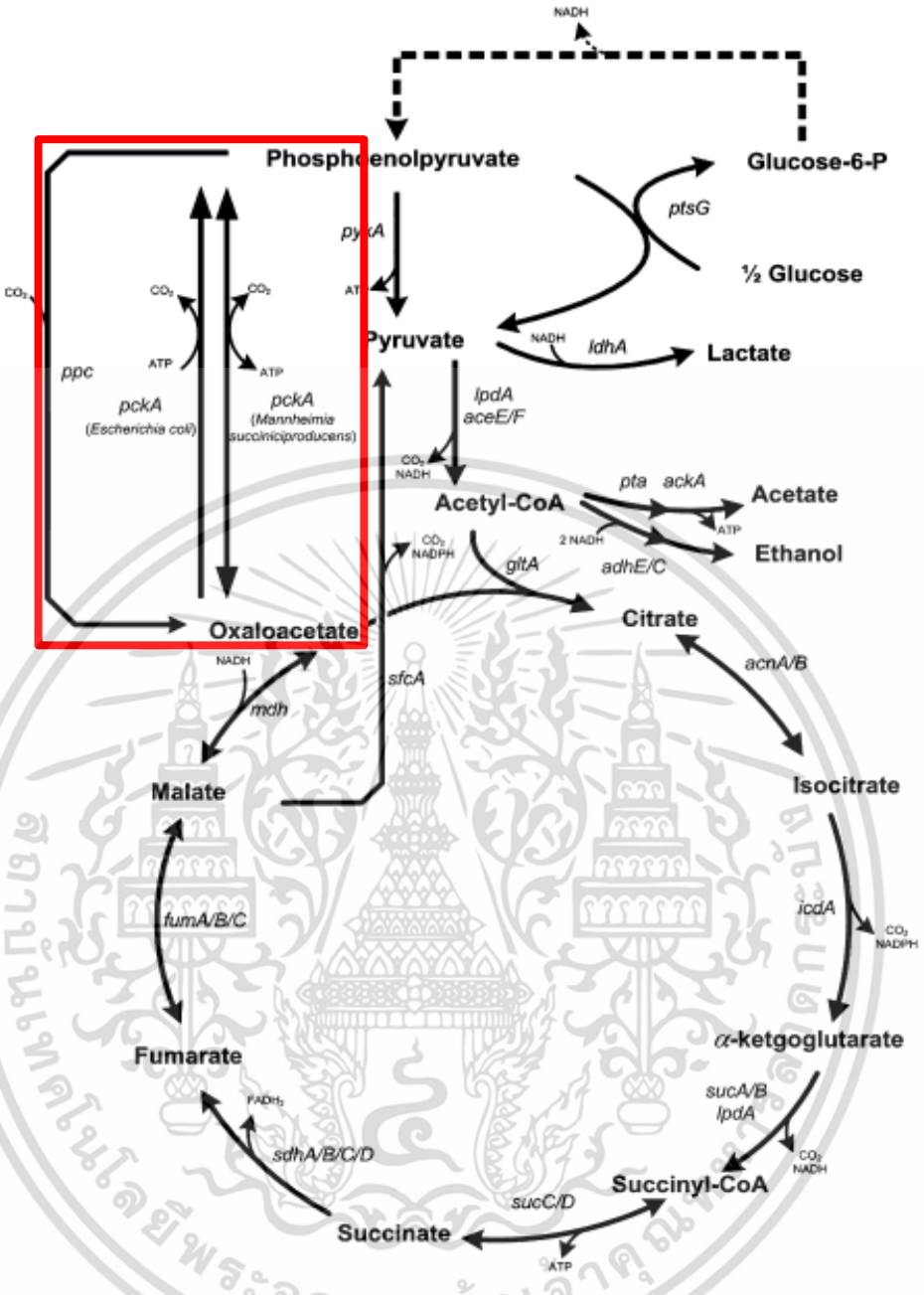
Microorganism	Bioreactor	Time (h)	PMA (g/L)	Malic acid (g/L)	Productivity (g/L/h)	Yield (g/g)	Referent
Natural malic acid producers							
Aspergillus niger ATCC 9142	Shake flask	192	-	113	0.1	0.80	West (2011)
Zygosaccharomyces rouxii	Test tube	140	-	75	0.52	0.40	Taing และ Taing (2007)
Monascus areneosus ST91	Shake flask	120	-	28	0.23	0.37	Lumyong และ Tomita (1993)
Aurebasidium pullulans ZD-3d	10 L fermentor	162	57.2	65.7	0.35	0.47	Zhang และคณะ (2011a)
A. pullulans CBS591.75	1 L fermentor	216	13.9	16.0	0.06	0.15	Liu และ Steinbuchel (1997)
Engineered producers							
Escherichia coli WGS - 10	5 L fermentor	12	-	9.25	0.74	0.42	Moon และคณะ (2008)
Escherichia coli XZ658	3 L fermentor	72	-	34	0.47	1.06	Zhang และคณะ (2011)
Saccharomyces cerevisiae	Shake flask	310	-	59	0.19	0.31	Zelle และคณะ (2008)

ที่มา : Zou และคณะ (2013)

2.3.2.1 กระบวนการผลิตกรดมาลิคโดยแบคทีเรีย

กรดมาลิคถูกนำไปใช้ในด้านอุตสาหกรรมทั้งใช้เป็นวัตถุเจือปนอาหารและใช้ในด้านการสังเคราะห์ทางเคมีต่างๆ เป็นต้น ซึ่งกรดมาลิคสามารถผลิตได้ด้วยวิธีต่างๆ เช่น การสกัดจากพืชการสังเคราะห์ด้วยเอนไซม์ฟูมาเรส และการสังเคราะห์ทางเคมี เป็นต้น จากงานวิจัยของ Moon และคณะ (2008) ได้มีการศึกษาการผลิตกรดมาลิคในแบคทีเรีย *E. coli* ที่ผ่านการตัดต่อยีนที่สนใจจากแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากกระเพาะของวัว คือ *Mannheimia succinicproducens* MBEL55E ผลจากการนำยีน *pckA* ของเชื้อ *Mannheimia succinicproducens* MBEL55E ที่มีการสังเคราะห์เอนไซม์ Phosphoenolpyruvate carboxykinase เข้าไปในเชื้อ *E. coli* ส่งผลให้การแสดงออกของยีน *E. coli pckA* ผลิตเอนไซม์ฟอสโฟอีนอลไพรูเวทคาร์บอกซิไคเนส (Phosphoenolpyruvate carboxykinase) ซึ่งทำหน้าที่เปลี่ยนฟอสโฟอีนอลไพรูเวท (Phosphoenolpyruvate) เป็น oxaloacetate เพื่อสังเคราะห์กรดมาลิคต่อไป ดังรูปที่ 2.6 หลังจากเพาะเลี้ยง *E. coli pckA* ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง โดยใช้กลูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน 20 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตกรดมาลิคได้ความเข้มข้น 9.25 กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.6 วิถีเมตาบอลิกของเชื้อ *E. coli* เมื่อ *aceE/F* คือ Pyruvate dehydrogenase multien-zyme conmplex, *acnA/B* คือ Aconitase, *adhE/C* คือ Alcohol dehydrogenase, *fumA/B/C* คือ Fumarase, *gltA* คือ Citrate synthase, *icdA* คือ Isocitrate dehydrogenase, *ldhA* คือ D-lactate dehydrogenase, *mdh* คือ Malate dehydrogenase, *pckA* คือ Phosphoenolpyruvate carboxykinase, *ppc* คือ Phosphoenolpyruvate carboxylase, *pta/ackA* คือ phosphate acetyltransferase/Acetate kinase, *ptsG* คือ Phosphotransferase system enzyme, *pykA* คือ Pyruvate kinase, *sfcA* คือ Malic enzyme, , *sdhA/B/C/D* คือ Succinate dehydrogenase, *sucA/B-lpdA* คือ **α**-ketoglutarate dehydrogenase complex, *sucC/D* คือ Succinyl-CoA synthe-tase

ที่มา : Moon และคณะ (2008)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

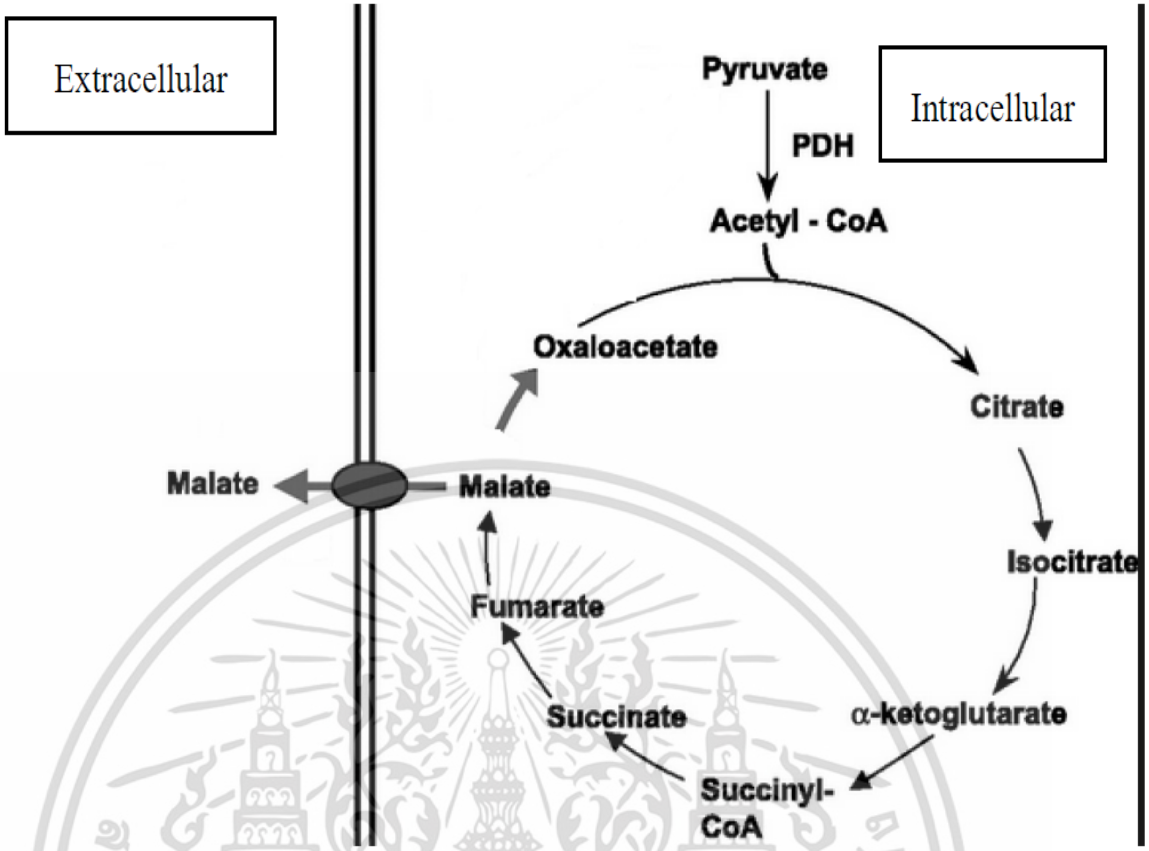
2.3.2.2 กระบวนการผลิตกรดมาลิคโดยยีสต์

ยีสต์เป็นจุลินทรีย์ที่มีความสามารถสูงในการสังเคราะห์กรดมาลิคผ่านวัฏจักรกรดไตรคาร์บอกซิลิค (TCA cycle) ที่บริเวณไซโตซอล (Cytosol) และไมโทคอนเดรีย (Mitochondria) ซึ่งหากวัฏจักร rTCA (Reductive Tricarboxylic acid) ลดลงส่งผลทำให้ มีการผลิตกรดมาลิคที่บริเวณไมโทคอนเดรีย (Mitochondria) เพิ่มมากขึ้น (Nakayama และคณะ, 2012) โดยเริ่มต้นจากน้ำตาลกลูโคสเข้าสู่วัฏจักรไกลโคไลซิส (EMP pathway) เพื่อย่อยสลายกลูโคสให้ได้ผลิตภัณฑ์คือไพรูเวทที่บริเวณไซโตซอล (Cytosol) ซึ่งน้ำตาลกลูโคส 1 โมเลกุล จะเปลี่ยนเป็นไพรูเวท 2 โมเลกุล จากนั้นไพรูเวทถูกออกซิไดซ์ได้ผลิตภัณฑ์ คือคาร์บอนไดออกไซด์ 1 โมเลกุล และได้สารที่มีหมู่แอซีทิล (Acetyl group) อีก 1 โมเลกุล ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับโคเอนไซม์เอ (Co-enzyme A, CoA) ได้ผลิตภัณฑ์คือแอซีทิล-โคเอ ซึ่งไพรูเวท 1 โมเลกุล จะเปลี่ยนเป็น แอซีทิล-โคเอ 1 โมเลกุล จากนั้นจะเข้าสู่วัฏจักรกรดไตรคาร์บอกซิลิค (TCA cycle) เพื่อผลิตกรดมาลิคและส่งออกนอกเซลล์ ดังรูปที่ 2.7

จากงานวิจัยของ Dakin (1924) ได้ทำการศึกษาการผลิตกรดมาลิคที่ได้จากการหมักยีสต์ ซึ่งในการผลิตกรดมาลิคสามารถผลิตได้จากเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ เช่น แบคทีเรีย ยีสต์ และรา เป็นต้น การผลิตกรดมาลิคด้วยเชื้อ *Aspergillus flavus* เป็นที่ประสบผลสำเร็จเป็นอย่างมากซึ่งเชื้อ *Aspergillus flavus* สามารถผลิตกรดมาลิคได้สูงถึง 63% ในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน (Battat และคณะ, 1991) แต่หลังจากนั้นพบว่าในการผลิตกรดมาลิคด้วยเชื้อ *Aspergillus flavus* สามารถผลิตสารพิษ (Aflatoxin) ซึ่งเป็นพิษต่อเซลล์ดังนั้น Food-grade chemical จึงไม่ใช้ *Aspergillus flavus* ในทางอุตสาหกรรมอาหารอีกต่อไป (Geiser และคณะ, 1998)

ในปี 1997 Pines และคณะ ได้ศึกษาการผลิตกรดมาลิคด้วยเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ รวมทั้งเชื้อ *Sacchromyces cerevisiae* ด้วยดังตารางที่ 2.3 โดยสามารถผลิตกรดมาลิคด้วย *Sacchromyces cerevisiae* ได้ถึง 12 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้ในปี 2007 Taing และ Taing ได้ทำการคัดแยกเชื้อยีสต์ *Zygosaccharomyces rouxii* จากธรรมชาติ และมีความสามารถผลิตกรดมาลิคได้ถึง 75 กรัมต่อลิตร ในอาหารที่มีกลูโคสความเข้มข้น 300 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนปริมาณอีกด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.7 การผลิตกรดมาลิคในวัฏจักรกรดไตรคาร์บอกซิลิค (Tricarboxylic acid cycle)
ที่มา : Jensen และคณะ (2008)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.3 แสดงปริมาณกรดมาลิค และผลได้ที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ต่างๆ

เชื้อจุลินทรีย์	กรดมาลิค (กรัมต่อลิตร)	ผลได้ (โมลต่อโมล)	จำนวนผลผลิตต่อปัจจัยการผลิต (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)	อ้างอิง
เชื้อรา				
Aspergillus flavus	60	0.84	0.1	Abe และคณะ (1962)
	36	0.51	0.19	Peleg และคณะ (1988)
	113	1.26	0.59	Battat และคณะ (1991)
Rhizopus arrhizus	48	0.81	0.34	Takao และคณะ (1983)
Paecilomyces varioti	48	0.81	0.34	Takao และคณะ (1983)
Monascus araneosus	28	0.50	0.23	Lumyong และTomita (1993)
Schizophyllum commune	18	0.48	0.16	Kawagoe และคณะ (1997)
เชื้อยีสต์				
Zygosaccharomyces rouxii	75	0.52	0.54	Taing และTaing (2007)
Sacchromyces cerevisiae	1	-	0.01	Fatichenti และคณะ (1984)
	2	-	-	Schwartz และ Radler (1988)
	6	0.09	0.18	Pines และคณะ (1996)
	12	0.13	0.38	Pines และคณะ (1997)
	59	0.42	0.19	Zelle และคณะ (2008)

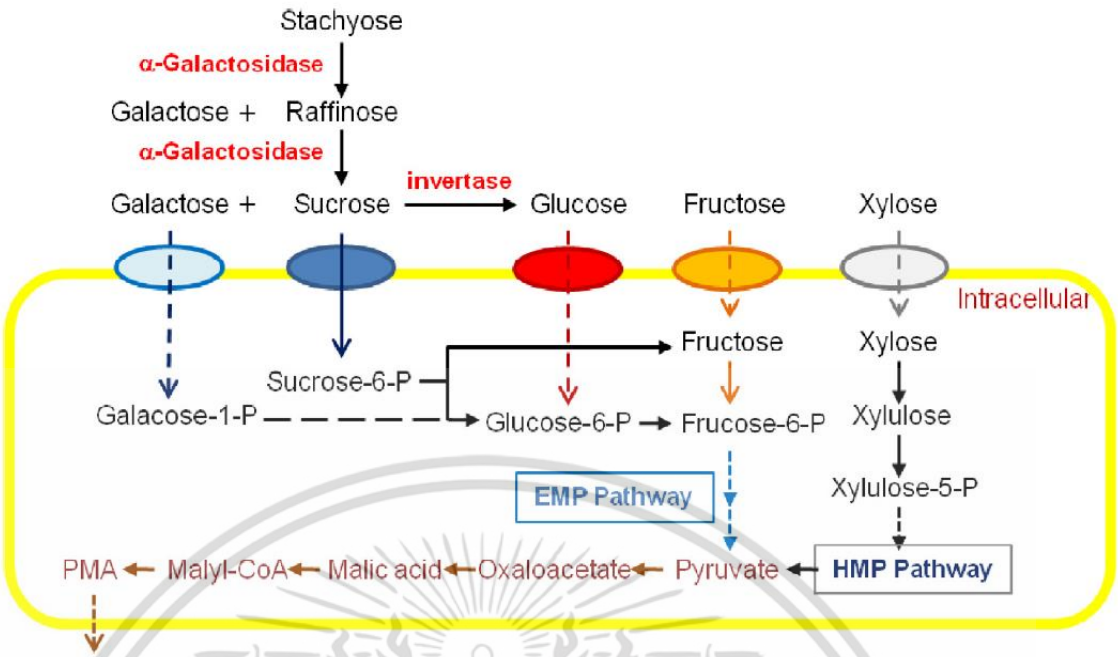
ที่มา : Zelle และคณะ (2008)

2.3.2.3 กระบวนการผลิตกรดมาลิคโดยเชื้อรา

ในปัจจุบันการผลิตกรดมาลิคในภาคอุตสาหกรรมอาศัยการเร่งปฏิกิริยาเปลี่ยนสาร เบนซีน (Benzene) หรือ เอ็น-บิวเทน (N-butane) เป็นกรดมาเลอิค แล้วจึงเปลี่ยนเป็นกรดมาลิค โดยอาศัยปฏิกริยาไฮเดรชั่น (Hydration) (Nexant, 2009) แต่กรดมาลิคที่ได้จะอยู่ในรูปแอลฟอร์ม (L-form) และดีฟอร์ม (D-form) ทำให้ต้องเสียค่าใช้จ่ายในการแยกให้บริสุทธิ์กรดมาลิคที่อยู่ในรูปแอล-ไอโซเมอร์ (L-isomer) เป็นสารตัวกลางที่สำคัญในวัฏจักรกรดไตรคาร์บอกซิลิค และยังสามารถผลิตได้ด้วยจุลินทรีย์ต่างๆ เช่น แบคทีเรีย ยีสต์ และเชื้อรา เป็นต้น (Zelle และคณะ, 2008) วัฏจักรที่ใช้ในการผลิตกรดมาลิค เริ่มจากวิถีไกลโคไลซิส (Glycolysis) และได้ผลิตภัณฑ์ คือ Pyruvate จากนั้นเกิดปฏิกิริยาคาร์บอกซิเลชั่น (Carboxylation) โดยอาศัยเอนไซม์ Pyruvate carboxylase ซึ่งจะเปลี่ยน Pyruvate ไปเป็น Oxaloacetate และ Oxaloacetate จะเปลี่ยนไปเป็น Malate ด้วยเอนไซม์ Malate dehydrogenase (Brown และคณะ, 2013)

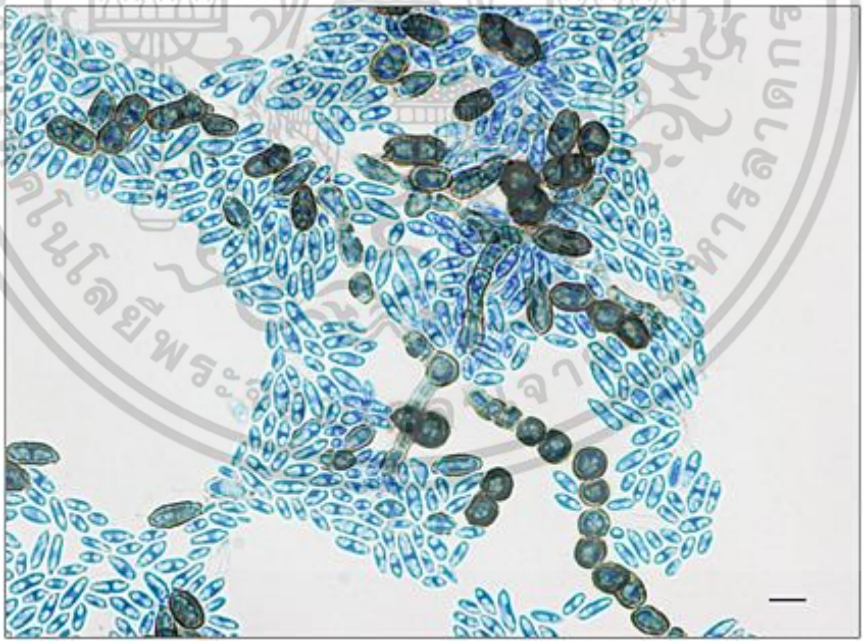
โดยทั่วไปในผลิตกรดมาลิคด้วยการใช้น้ำตาลราฟฟิโนส กาแลคโตส หรือซูโครส จะได้ผลผลิตที่ค่อนข้างต่ำเมื่อเทียบกับการใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน แต่จุลินทรีย์บางชนิดก็สามารถใช้น้ำตาลทั้งสามชนิดในการผลิตกรดมาลิคได้ เช่น เชื้อรา *Aureobasidium pullulans* เนื่องจากสามารถผลิตเอนไซม์ α-galactosidase ที่สามารถย่อยสลายแลคโทส (Lactose) ได้และเอนไซม์ β-furanosidases ย่อยสลายน้ำตาล (Raffinose) เพื่อผลิตกรดมาลิคได้ ดังรูปที่ 2.8 (Cheng และคณะ, 2017) *A. pullulans* เป็นเชื้อราที่มีรูปร่างคล้ายยีสต์ ดังรูปที่ 2.9 มีชื่อสามัญว่า “Black yeast” เนื่องจากผลิตเม็ดสีเมล่านินได้ในระหว่างการเจริญเติบโตทำให้ได้โคโลนีมีสีดำแต่เมื่อใช้น้ำตาลไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยงในสภาวะเขย่าไม่พบการผลิตเม็ดสีขึ้น ซึ่งเป็นสิ่งที่น่าสนใจมากเมื่อเทียบกับน้ำตาลอื่นๆ และมีประสิทธิภาพในการผลิตกรดโพลีมาลิค (PMA) ได้ดีที่สุด (Zou และคณะ, 2016) *Asperjillus oryzae* เป็นเชื้อราชนิดหนึ่งที่สามารถผลิตกรดมาลิคได้สูงแต่จะมีการผลิตสารพิษอะฟลาทอกซิน (Aflatoxin) จึงหันมาสนใจ *Asperjillus flavus* ที่สามารถผลิตกรดมาลิคได้สูงและมีขั้นตอนการหมักที่เหมาะสม และได้นำมาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหารในเอเชีย เช่น ซอสปรุงรส สาเก และน้ำส้มสายชู เป็นต้น ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบความใกล้เคียงกันของดีเอ็นเอระหว่างเชื้อ *A. flavus* และ *A. oryzae* พบว่ามีขนาดดีเอ็นเอ 36.8 Mb 12,197 ยีน และ 36.7 Mb 12,079 ยีน ตามลำดับ และมี Orthologous gene ที่สูงเช่นกัน ซึ่งแสดงถึงการมีบรรพบุรุษร่วมกัน (Knuf และ Nookaew, 2014)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.8 การเมตาบอไลท์ของน้ำตาล และการสังเคราะห์กรดโพลีมาลิคด้วยเชื้อ *Aureobasidium pullulans*

ที่มา : Cheng และคณะ (2017)



รูปที่ 2.9 เชื้อรา *Aureobasidium pullulans* ที่มีความสามารถในการผลิตกรดมาลิค

ที่มา : https://www.inspq.qc.ca/en/moulds/fact-sheets/aureobasidium-pullulans

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 แหล่งคาร์บอนที่ใช้ในกระบวนการสังเคราะห์กรดมาลิค

ปัจจัยที่ส่งผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์มีหลายประการ ได้แก่ สารอาหาร อุณหภูมิ ความเป็นกรด-เบส ออกซิเจน และแหล่งคาร์บอน เป็นต้น โดยแหล่งคาร์บอนที่จุลินทรีย์ใช้เป็นสารอาหารในการเจริญเติบโต คือ น้ำตาล (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ, 2544)

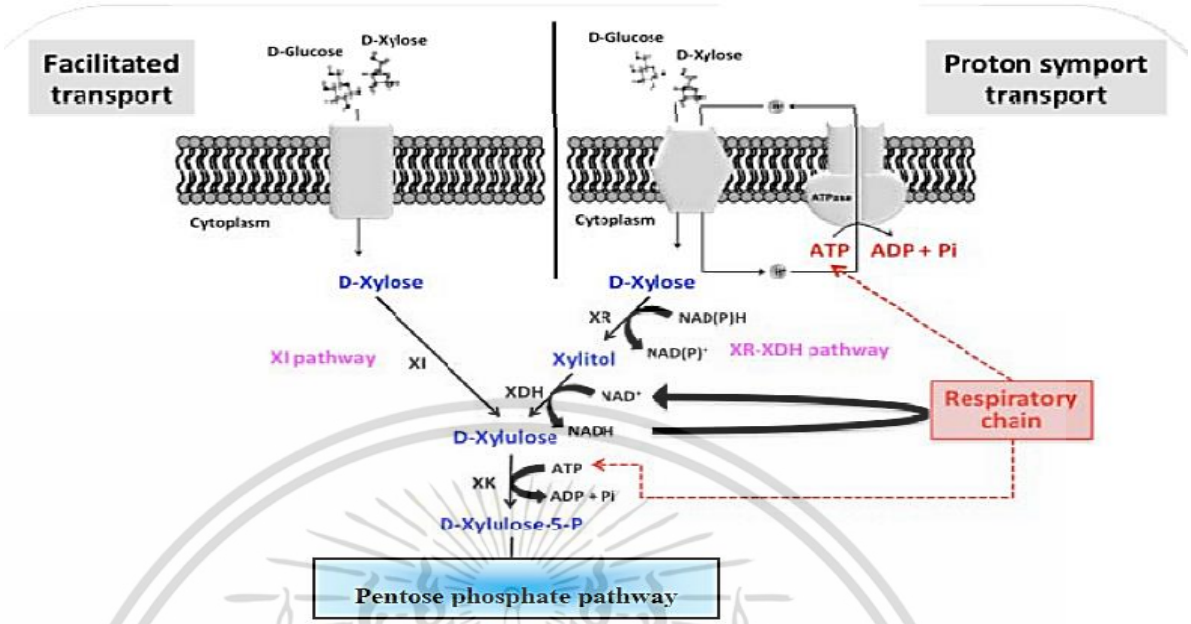
การสังเคราะห์กรดมาลิคในกระบวนการทางชีวภาพเป็นการเปลี่ยนน้ำตาลด้วยกระบวนการเมทาบอลิซึมของจุลินทรีย์ให้เป็นกรดอินทรีย์ ซึ่งในทางอุตสาหกรรมวัตถุดิบที่นิยมใช้เป็นแหล่งคาร์บอนคือน้ำตาล เช่น น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลไซโลส และน้ำตาลซูโครส เป็นต้น นอกจากนี้ได้มีการพัฒนากระบวนการผลิตต่างๆเพื่อให้มีราคาต้นทุนลดลง ซึ่งตัวอย่างแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในกระบวนการผลิตทางชีวภาพมีดังนี้

1. น้ำตาล เช่น กลูโคส ไซโลส และซูโครส เป็นต้น การสังเคราะห์กรดมาลิคทางชีวภาพระยะแรกนิยมใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน เนื่องจากสามารถผลิตกรดมาลิคได้ในปริมาณสูง (4.5 กรัมต่อลิตร โดยเชื้อรา *Aureobasidium pullulans*) (Liu และ Steinbuchel, 1997) แต่ข้อเสียของการใช้น้ำตาลกลูโคสคือ มีราคาค่อนข้างสูงจึงมีการใช้น้ำตาลที่มีราคาต้นทุนลดลง แต่ผลผลิตที่ได้นั้นอาจแตกต่างกันทั้งในด้านราคาต้นทุนและประสิทธิผล โดยตารางที่ 2.4 แสดงการเปรียบเทียบการผลิตกรดมาลิคโดยใช้น้ำตาลชนิดต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอน

น้ำตาลเป็นคาร์โบไฮเดรตชนิดหนึ่งเป็นแหล่งพลังงานที่สำคัญของสิ่งมีชีวิตร่วมถึงจุลินทรีย์ ดังนั้นจุลินทรีย์จึงมีกลไกลต่างๆที่เปลี่ยนน้ำตาลเป็นแหล่งพลังงานเพื่อใช้เจริญและผลิตสารต่างๆ รวมถึงการผลิตกรดมาลิค น้ำตาลไซโลสเป็นน้ำตาล 5 คาร์บอน ซึ่งจุลินทรีย์ส่วนมากไม่สามารถใช้เป็นแหล่งพลังงานได้โดยตรง จำเป็นจะต้องเปลี่ยนน้ำตาลไซโลส เป็นไซลูโลส-5-ฟอสเฟต (Xylulose-5-phosphate, X5P) ก่อนเพื่อเข้าสู่วิถีเพนโตสฟอสเฟต (Pentose phosphate pathway, PPP) และเข้าสู่กระบวนการไกลโคไลซิสต่อไปเพื่อให้ได้พลังงานมาใช้ประโยชน์ และสร้างสารต่างๆ ส่วนในยีสต์ที่สามารถใช้น้ำตาลไซโลสในการหมัก และส่วนใหญ่น้ำตาลไซโลสถูกเปลี่ยนเป็นไซลิทอลด้วยเอนไซม์ไซโลสรีดักเทส (Xylose reductase, XR) และเปลี่ยนไซลิทอลเป็นดีไซลูโลส (D-xylulose) ด้วยเอนไซม์ไซลิทอลดีไฮโดรจีเนส (Xylitol dehydrogenase, XDH) จากนั้นใช้เอนไซม์ไซลูโลไคเนส (Xylulokinase) เพื่อเติมหมู่ฟอสเฟต (Phosphate) ได้เป็นไซลูโลส-5-ฟอสเฟต (Xylulose-5-phosphate, X5P) ก่อนจะเข้าสู่วิถีเพนโตสฟอสเฟต (Hahn-Hagerdal และคณะ, 2007) ในขณะที่แบคทีเรียสามารถเปลี่ยนไซโลสไปเป็นไซลูโลส (Xylulose) ในหนึ่งขั้นตอนด้วยเอนไซม์ไอโซเมอเรส (Isomerase) (Vongsuvanlert และ Tani, 1988) ดังรูปที่ 2.10

ในปี ค.ศ. 2016 Zou และคณะ ได้ค้นพบเชื้อราสายพันธุ์ใหม่ คือ *Aureobasidium pullulans* YJ 6–11 ที่สามารถใช้น้ำตาลไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อผลิตกรดมาลิคและได้ปริมาณสูงกว่าการใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งยีสต์ที่ใช้ในการผลิตกรดมาลิคนั้นคัดแยกได้จากต้นพืชสด และบริเวณรอบๆเทือกเขาจินยัน ประเทศจีน ซึ่งปริมาณกรดมาลิคและโพลีมาลิคที่ผลิตได้โดยเชื้อดังกล่าวแสดงดังตารางที่ 2.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.10 กระบวนการเปลี่ยนน้ำตาลไซโลสเป็นไซลูโลสของเชื้อจุลินทรีย์
ที่มา : Hahn-Hagerdal และคณะ (2007)

ตารางที่ 2.4 การผลิตกรดโพลีมาลิคและกรดมาลิคจากแหล่งคาร์บอนต่างๆโดยเชื้อรา *Aureobasidium pullulans*

แหล่งคาร์บอน (ความเข้มข้น)	กรดโพลีมาลิค (กรัมต่อลิตร)	กรดมาลิค (กรัมต่อลิตร)
Glucose (10%)	4.5	0.1
Sucrose (5%)	3.9	0.2

ที่มา : ดัดแปลงจาก Liu และ Steinbuchel (1997)

ตารางที่ 2.5 ปริมาณกรดมาลิคที่ผลิตได้โดยเชื้อรา *A. pullulans* สายพันธุ์ต่างๆ

สายพันธุ์จุลินทรีย์	แหล่งคาร์บอน	กรดโพลีมาลิค (กรัมต่อลิตร)	กรดมาลิค (กรัมต่อลิตร)
A. pullulans ZD-3d	กลูโคส	57.2	65.7
A. pullulans CBS591.75	กลูโคส	13.9	16.0
A. pullulans YJ 6–11	ไซโลส	80.4	91.2

ที่มา : Zou และคณะ (2016)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. วัสดุลิกโนเซลลูโลส เป็นวัสดุชีวมวลที่พบได้ทั่วไปในโลก วัสดุลิกโนเซลลูโลสส่วนใหญ่เป็นวัตถุดิบเหลือทิ้งทางการเกษตรที่หาได้ง่าย และมีราคาถูก เช่น ฟางข้าว ซังข้าวโพด เป็นต้น วัตถุดิบลิกโนเซลลูโลสที่ใช้เป็นวัตถุดิบตั้งต้นในการผลิตกรดอินทรีย์นั้นจำเป็นต้องผ่านการปรับสภาพขั้นต้น (Pretreatment) เพื่อกำจัดลิกนินออกจากเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส ส่งผลให้การทำงานของเอนไซม์มีประสิทธิภาพมากขึ้น ซึ่งวิธีการปรับสภาพทำได้หลายวิธี เช่น วิธีทางกายภาพ วิธีทางเคมี และวิธีทางกายภาพร่วมกับเคมี แต่การปรับสภาพเบื้องต้นยังไม่สามารถย่อยสลายเซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลสให้ได้เป็นน้ำตาล จึงจำเป็นต้องผ่านกระบวนการย่อยสลายด้วยเอนไซม์เพื่อให้ได้น้ำตาลที่จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ได้ (Xu และคณะ, 2012)

ในงานวิจัยที่ผ่านมามีการพัฒนาและนำวัสดุลิกโนเซลลูโลสมาใช้มากขึ้น ในปี ค.ศ. 2013 Leathers และ Manitchotpisitm ได้รายงานผลการเปรียบเทียบการผลิตกรดมาลิคด้วยเชื้อรา *Aureobasidium pullulans* 4 สายพันธุ์ โดยใช้วัตถุดิบเหลือทิ้งทางเกษตรต่างชนิดกันที่ผ่านการปรับสภาพแล้วเป็นแหล่งคาร์บอนและเติมแคลเซียมคาร์บอเนตเป็นตัวปรับพีเอชของอาหาร ดังตารางที่ 2.6 พบว่าวัตถุดิบทางเกษตรโดยเฉพาะฟางข้าว ให้ปริมาณกรดมาลิคสูง (Leathers และ Manitchotpisit, 2013)

3. ของเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น กลีเซอรอล ของเสียจากการกลั่นเหล้า (Thin stillage) และกากน้ำตาล เป็นต้น การนำวัตถุดิบเหลือทิ้งทางอุตสาหกรรมมาใช้ประโยชน์เพื่อการผลิตกรดอินทรีย์ เป็นอีกวิธีหนึ่งที่สามารถลดต้นทุนการผลิตและลดมลพิษทางสิ่งแวดล้อมได้ เช่น การผลิตกรดมาลิคด้วยเชื้อรา *Aspergillus* sp. สายพันธุ์ ATCC 10577 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 192 ชั่วโมง โดยใช้กากของเสียจากการกลั่นเหล้า (Thin stillage) เป็นวัตถุดิบตั้งต้นแทนการใช้น้ำตาล ซึ่ง Thin stillage เป็นวัตถุดิบที่มีราคาถูก ประกอบด้วยปริมาณ Glycerol และ ไนโตรเจนที่ค่อนข้างสูง และเหมาะต่อการนำไปผลิตแอลกอฮอล์หรือกรดอินทรีย์ ปริมาณกรดมาลิคที่เชื้อรา *Aspergillus* sp. สายพันธุ์ ATCC 10577 ผลิตได้ประมาณ 20 กรัมต่อลิตร โดยใช้ปริมาณกากของเสียจากการกลั่นเหล้า (Thin stillage) ที่เจือจางให้มีปริมาณกลีเซอรอล 17.1 กรัมต่อลิตร และกลูโคส 3.4 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน (West, 2011)

นอกจากนี้ยังพบการผลิตกรดมาลิคด้วยเชื้อรา *Ustilago trichophora* TZ1 โดยใช้กลีเซอรอลปริมาณ 50 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน และใช้แคลเซียมคาร์บอเนตเป็นตัวปรับพีเอชของอาหาร ซึ่งปริมาณกรดมาลิคที่ผลิตได้ คือ 200 กรัมต่อลิตร ซึ่งถือว่าเป็นปริมาณสูงสุดเมื่อเทียบกับการผลิตกรดมาลิคด้วยจุลินทรีย์จากแหล่งคาร์บอนอื่นๆ (Zambanini และคณะ, 2016)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.6 การผลิตกรดโพลี-เบต้า-แอลมาลิค (poly-β-L-malic acid) (PMA) ด้วยวัตถุดิบทางเกษตรโดย *Aureobasidium pullulans* สายพันธุ์ต่างๆ

สายพันธุ์	วัตถุดิบตั้งต้นที่ใช้ผลิตกรดโพลีมาลิค (PMA) (กรัมโพลีมาลิคต่อลิตร)						
	Glucose + $CaCO_3$	Corn fiber	Corn fiber + $CaCO_3$	Corn fiber + $CaCO_3$ + enzyme	Wheat straw	Wheat straw + $CaCO_3$	Wheat straw + $CaCO_3$+ enzyme
NRRLY-2311-1	10.5±0.2	7.2±0.2	10.9±0.4	13.2±0.3	9±0.1	11.2±0.3	18.9±0.8
NRRL 50382	12.4±1.0	2.2±0.2	3.6±1.5	5.6±0.2	7.5±0.3	5.8±0.8	15±4.5
NRRL 50383	18.8±0.8	2.1±0.1	2.8±0.4.	10.1±1.0	5.7±0.8	4.6±0.4	23.5±1.5
NRRL 50384	15.4±0.7	3.8±0.1	3.8±0.1	6.8±0.2	7.2±0.4	7.2±0.1	15.6±0.2

ที่มา : ดัดแปลงจาก Leathers และ Manitchotpisit (2013)

2.5 สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดมาลิค

ในปี ค.ศ.1991 Battat และคณะ ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดอินทรีย์โดยเชื้อรา *Aspergillus flavus* สายพันธุ์ A-114 ในถังหมักขนาด 16 ลิตร โดยศึกษาผลของอัตราการปั่นกวน ความเข้มข้นของไอออนต่างๆ และปริมาณไนโตรเจนในอาหาร โดยในการเพาะเลี้ยงใช้กลูโคสปริมาณ 120 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน และใช้แคลเซียมคาร์บอเนต 90 กรัมต่อลิตร

จากการศึกษาความเร็วรอบของการปั่นกวนระหว่าง 300–450 รอบต่อนาที พบว่าที่ความเร็วรอบ 350 400 และ 450 รอบต่อนาที ให้ร้อยละผลได้ของกรดมาลิคที่ชั่วโมงที่ 160 ใกล้เคียงกัน คือ 57 56 และ 71 ตามลำดับ และที่ความเร็ว 300 รอบต่อนาทีให้ร้อยละผลได้ของกรดมาลิคที่ชั่วโมงที่ 160 น้อยที่สุด คือ 51 โมลต่อโมลน้ำตาล ดังตารางที่ 2.7 จากผลที่ได้แสดงให้เห็นว่าที่ความเร็วรอบ 300 รอบต่อนาทีเชื้อรามีการเจริญของเส้นใยต่ำ แต่เมื่อเพิ่มความเร็วรอบให้สูงขึ้นจะช่วยให้เส้นใยเจริญมากกว่า และลดเส้นผ่านศูนย์กลางของ Pellet ให้เล็กลง เนื่องจากการผลิตกรดในวัฏจักรกรดไตรคาร์บอกซิลิคโดยราเป็นกระบวนการที่ต้องอาศัยออกซิเจน ดังนั้นอัตราการปั่นกวนรวมทั้งความดันและการให้อากาศในถังหมักจึงมีความสำคัญต่อการแลกเปลี่ยนออกซิเจนอย่างมาก โดยจะเห็นได้จากการเจริญของเส้นใยได้ดีในอัตราการปั่นกวนที่ 450 รอบต่อนาทีส่งผลให้สามารถผลิตกรดมาลิคได้ปริมาณสูง

ตารางที่ 2.7 การผลิตกรดมาลิคโดย *Aspergillus flavus* เมื่อเพาะเลี้ยงในอัตราการปั่นกวนที่แตกต่างกัน

Impeller speed (rpm)	Time (h)	Glucose consumed (mol)	% yield of malic acid
300	95	022	23
	160	054	51
350	65	0.25	41
	160	0.38	57
400	65	0.27	43
	160	0.46	56
450	65	0.19	50
	160	0.41	71

ที่มา : ดัดแปลงจาก Battat และคณะ (1991)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการศึกษาความเข้มข้นของไนโตรเจนโดยการเพิ่มหรือลดความเข้มข้นของไนโตรเจนจากความเข้มข้นของไนโตรเจนเริ่มต้น เท่ากับ 387 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าเชื้อรา *Aspergillus flavus* สามารถผลิตกรดมาลิคสูงสุด 41 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้ความเข้มข้นของไนโตรเจนเท่ากับ 271 มิลลิกรัมต่อลิตร และเมื่อเพิ่มปริมาณไนโตรเจนสูงขึ้น 520 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งผลให้มีปริมาณเซลล์แห้งเพิ่มสูงขึ้น 11.5 กรัมต่อลิตร ดังตารางที่ 2.8 ดังนั้นความเข้มข้นของไนโตรเจนต่ำจึงเหมาะสมต่อการผลิตกรดมาลิค เนื่องจากให้ร้อยละผลได้สูงและมวลเซลล์ของรายังผลิตได้น้อยจึงง่ายต่อการแยกผลิตภัณฑ์อีกด้วย (Battat และคณะ, 1991)

ตารางที่ 2.8 การผลิตกรดมาลิคโดย *Aspergillus flavus* เมื่อใช้ความเข้มข้นของไนโตรเจนเริ่มต้นต่างกัน

Nitrogen concentration (mg/L)	Cell dry weight (g/L)	Glucose consumed (g/L)	% yield of malic acid
154	4.3	0.13	80
271	7.4	0.31	98
307	7.3	0.19	95
387	9.5	0.42	63
435	10.3	0.30	65
480	11.1	0.35	67
520	11.5	0.46	56

ที่มา : ดัดแปลงจาก Battat และคณะ (1991)

จากการศึกษาโลหะไอออนที่ส่งผลต่อการผลิตกรดมาลิค โดย *Aspergillus flavus* สายพันธุ์ A-114 ในถังหมักขนาด 16 ลิตร โดยใช้กลูโคส 120 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และใช้โลหะไอออน 3 ชนิด ได้แก่ Fe^{2+}, Mg^{2+} และ Mn^{2+} ดังตารางที่ 2.9 พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ Fe^{2+} เท่ากับ 12 มิลลิกรัมต่อลิตร ควบคู่กับการใช้ Mg^{2+} ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งผลให้ร้อยละผลได้ของกรดมาลิคเพิ่มสูงขึ้น และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ Mg^{2+} เท่ากับ 10 มิลลิกรัม ส่งผลให้ร้อยละผลได้ของกรดมาลิคเพิ่มสูงขึ้นถึง 107

จากผลการศึกษาพบว่าโลหะไอออนมีผลต่อการผลิตกรดมาลิคใน *A. flavus* โดย Fe^{2+} ถือเป็นปัจจัยหลักต่อการผลิตกรดมาลิคเมื่อใช้ปริมาณของ Fe^{2+} อย่างเหมาะสมร่วมกับ Mg^{2+} ในปริมาณที่เหมาะสมและจากผลการศึกษาพบว่าการเติม Mn^{2+} ในอาหารส่งผลให้การผลิตกรดมาลิคโดย *A. flavus* ลดลง ซึ่งตรงข้ามจากงานวิจัยของ Abe และคณะ (1962) ที่กล่าวว่า การเติม Mn^{2+} จะทำให้ความเข้มข้นของกรดมาลิคเพิ่มสูงขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.9 การผลิตกรดมาลิคโดย *Aspergillus flavus* เมื่อใช้ความเข้มข้นของโลหะไอออนแตกต่างกัน

Metal ion concentration			Glucose consumed (mol)	% Yield (malic acid)
Fe^{2+} (mg/L)	Mg^{2+} (mg/L)	Mn^{2+} (mg/L)		
0.4	4	-	0.28	71
2.0	4	-	0.27	86
12.0	4	-	0.24	93
12.0	10	-	0.18	107
12.0	40	-	0.23	101
12.0	40	0.05	0.49	36
18.0	10	-	0.37	100
24.0	10	-	0.39	81

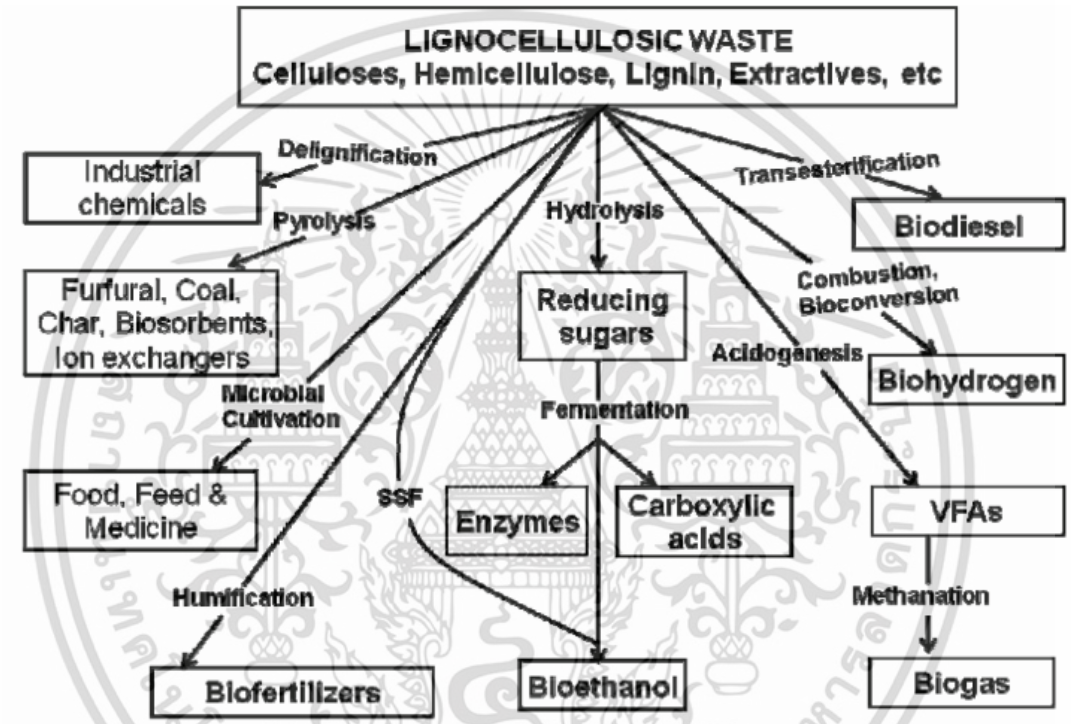
ที่มา : ดัดแปลงจาก Battat และคณะ (1991)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6 ข้อดีและข้อเสียของการผลิตกรดมาลิคด้วยกระบวนการทางเคมีและทางชีวภาพ

2.6.1 ข้อดีและข้อเสียในการผลิตกรดมาลิคด้วยกระบวนการทางเคมี

จากงานวิจัยของ Mtui ในปี ค.ศ. 2009 ได้มีการพัฒนากระบวนการผลิตโดยการแปรรูปวัสดุลิกโนเซลลูโลสที่มีเซลลูโลสซึ่งมีข้อดี คือ กระบวนการทางเคมีสามารถนำมาผลิตพลังงานทดแทน และเพิ่มมูลค่าผลิตภัณฑ์ (Value-added products) ต่างๆให้มากยิ่งขึ้น โดยกระบวนการแปรรูปมีด้วยกันมากมายหลายวิธี (ดังรูปที่ 2.11) ทั้งยังมีผลพลอยได้เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีคุณค่าสูง เช่น เอนไซม์ กรดอินทรีย์ชนิดต่างๆ พลาสติกย่อยสลายได้ ผลิตภัณฑ์ตั้งต้นสำหรับอุตสาหกรรมด้านเวชภัณฑ์ และเคมีภัณฑ์ชนิดต่างๆ เป็นต้น



รูปที่ 2.11 พลังงานและผลิตภัณฑ์มูลค่าเพิ่ม (Value-added products) ที่ผลิตได้จากชีวมวลที่มีเซลลูโลสสูง, SSF คือ simultaneous fermentation and saccharification, VFAs คือ volatile fatty acids

ที่มา : Mtui (2009)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตัวอย่างสารเคมีที่สามารถย่อยสลายวัสดุชีวมวล

1) อัลคาไลด์ (Alkaline) เช่น โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH), แอมโมเนีย (NH_3) และแอมโมเนียมซัลไฟด์ ($(NH_4)_2SO_4$) เป็นต้น
2) กรด เช่น กรดซัลฟิวริค (H_2SO_4), กรดไฮโดรคลอริค (HCl) และกรดฟอสฟอริค (H_3PO_4) เป็นต้น
3) แก๊ส เช่น คลอรีนไดออกไซด์ (ClO_2), ไนโตรเจนไดออกไซด์ (NO_2) และซัลเฟอร์ไดออกไซด์ (SO_2) เป็นต้น
4) สารละลายสกัดลิกนิน เช่น เอทานอล (Ethanol), เบนซีน (Benzene), เอธิลีนไกล-คอล (Ethyleneglycol) และ บิวทานอล (Butanol) เป็นต้น
5) อื่นๆ เช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) และโอโซน (Ozone) เป็นต้น

ข้อเสียของกระบวนการผลิตกรดมาลิคทางเคมี คือ สารตั้งต้นที่ใช้ เช่น กรดฟูมาริค และกรดมาเลอิค มีราคาแพง ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีความบริสุทธิ์ต่ำจึงต้องอาศัยขั้นตอนในการทำให้กรดมาลิคบริสุทธิ์หลายขั้นตอน และเกิดปฏิกิริยาที่รุนแรงทำลายสิ่งแวดล้อมอีกด้วย

2.6.2 ข้อดีและข้อเสียในการผลิตกรดมาลิคด้วยกระบวนการทางชีวภาพ

การใช้ประโยชน์จากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรรวมทั้งของเสีย (Wastes) และผลิตผลพลอยได้ (By-product) จากโรงงานอุตสาหกรรมเพื่อผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ โดยกระบวนการทางชีวภาพ เช่น เอทานอล กรดอินทรีย์ สารให้ความหวาน และตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดต่าง ๆ มีข้อดีข้อเสียดังนี้

ข้อดี ในการผลิตกรดอินทรีย์จากวัสดุเหลือใช้ชีวมวล โดยกระบวนการหมักทางชีวภาพ (Biological fermentation) เข้ามามีบทบาทเนื่องจาก วัตถุดิบที่มีราคาถูก เช่น วัสดุเหลือใช้จากอุตสาหกรรมอาหาร การเกษตร ฟาร์มปศุสัตว์ ป่าไม้ ของเสียที่เกิดจากกิจกรรมของมนุษย์ในเขตบ้านเรือนต่าง ๆ รวมทั้งกระดาษและของเสียจากอุตสาหกรรมเยื่อกระดาษ เป็นต้น โดยแหล่งที่ผลิตของเสีย และชนิดของเสียทางการเกษตรแสดงดังตารางที่ 2.10

โดยในระยะแรกใช้วัตถุดิบจำพวกน้ำตาลที่ได้จากพืชซึ่งมีน้ำตาลสูงมาก เช่น อ้อย หัวบีท และข้าวฟ่างหวาน เป็นต้น (สุขใจ, 2554)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.10 ของเสียและวัสดุเหลือใช้ที่ได้จากแหล่งผลิตต่างๆ

แหล่งที่ผลิตของเสีย	ชนิดของเสีย	สถานะของเสีย
กระดาษ และอุตสาหกรรมเยื่อกระดาษ	เซลลูโลส, เฮมิเซลลูโลส, ลิกโนซัลโฟเนต และไบซัลเฟต	ของแข็ง, ของเหลว และส่วนมากเป็นสารอินทรีย์
ของเสียเทศบาล	ขยะบ้านเรือน, ขยะกระดาษ, ผลไม้ และเปลือกผัก, ของเสียโรงงานฆ่าสัตว์, หนังสัตว์, น้ำเสีย และพลาสติก	ของแข็ง, ของเหลว และส่วนมากเป็นสารอินทรีย์
โรงงานน้ำตาล และโรงกลั่น	ชานอ้อย และกากน้ำตาล	ของแข็ง และของเหลว
ผลิตภัณฑ์นม และสัตว์ปีก	ผลิตภัณฑ์นมที่ไม่ใช้, มูลวัว, เปลือกไข่ และมูลนก	ของแข็ง และเป็นสารอินทรีย์
การเกษตร	ฟางข้าว, ข้าวเปลือก, พืชหัว, ข้าวโพด, เมล็ดพืช, ใบไม้, เส้นใยและก้านต้นฝ้าย, เปลือกถั่ว, เปลือกมะพร้าว และรำข้าว	ของแข็ง และเป็นสารอินทรีย์
อุตสาหกรรมอาหาร	เปลือกผลไม้ และส่วนเยื่อ, กระดูก และหนังสัตว์	ของแข็ง และเป็นสารอินทรีย์
ป่าไม้	เศษไม้, ใบไม้, ขี้เลื่อย, ฟืน, เมล็ด และเปลือกไม้ เป็นต้น	ของแข็ง และเป็นสารอินทรีย์

ที่มา : ดัดแปลงจาก Rastogi (2007)

ข้อเสีย น้ำตาลที่ได้จากพืชมีราคาสูงมาก ดังนั้น จึงมีการเปลี่ยนแหล่งวัตถุดิบ ที่ใช้ในกระบวนการหมักมาเป็นน้ำตาลที่ได้จากการย่อยแป้งชนิดต่างๆ เช่น แป้งมันสำปะหลัง แป้งข้าวโพด และแป้งมันฝรั่ง เป็นต้น และน้ำตาลที่ได้จากทรัพยากรที่สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ (Renewable resources) ซึ่งเป็นแหล่งวัตถุดิบทดแทน โดยใช้ความรู้ทางวิทยาศาสตร์ชีวภาพ รวมกับกระบวนการทางพันธุวิศวกรรม เพื่อให้กระบวนการผลิตมีต้นทุนต่ำ ได้ผลคุ้มค่าในทางเศรษฐศาสตร์ และใช้ผลิตในเชิงพาณิชย์ได้ นำไปสู่ความต้องการที่จะพัฒนาเทคโนโลยีสีเขียว (Green technology) เพื่อผลิตวัตถุดิบสีเขียว (Green feedstock) (สุขใจ, 2554)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.7 กระบวนการแยกกรดมาลิคให้บริสุทธิ์

กระบวนการแยกหรือทำกรดมาลิคให้บริสุทธิ์ คือการนำกรดมาลิคออกจากผลิตภัณฑ์ต่างๆ ที่เราไม่ต้องการ ซึ่งรวมกันอยู่ภายในน้ำหมักผ่านวิธีการต่างๆ เช่น

1. การทำให้เกิดผลึก (Direct crystallization) เป็นการนำกรดอินทรีย์ที่อบด้วยอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสมาทำการกลั่นภายใต้สภาวะลดความดัน (Vacuum distillation) และนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อให้เกิดการตกผลึกของกรดอินทรีย์ (Cheng และคณะ, 2012)

2. การแยกด้วยการทำให้ตกตะกอน (Precipitation) เป็นการแยกกรดอินทรีย์ออกจากน้ำหมักด้วยการเติมแคลเซียมไดไฮดรอกไซด์ ($CaOH_2$) หรือแคลเซียมออกไซด์ (CaO) หรือ แอมโมเนีย (NH_3) เพื่อให้เกิดตะกอนเกลือ แล้วนำตะกอนเกลือที่ได้ไปกรองด้วยกระดาษกรอง เพื่อให้ได้กรดมาลิคและกรดอินทรีย์ออกมา (Cheng และคณะ, 2012)

3. การแยกด้วยเมมเบรน (Membrane separation) ซึ่งเมมเบรนที่ควรนำมาใช้ในการแยก คือ Microfiltration, Ultrafiltration, Nanofiltration และ Electrodialysis (Cheng และคณะ, 2012) ซึ่งมีคุณสมบัติที่แตกต่างกัน คือ

3.1 Microfiltration : มีขนาด 0.1 ถึง 10 ไมครอน ใช้กรองแบคทีเรียและของแข็ง

3.2 Ultrafiltration : มีขนาด 0.005 ถึง 0.05 ไมครอน ใช้กรองไขมันในน้ำ รงควัตถุ และคอลลอยด์

3.3 Nanofiltration : มีขนาด 0.0005 ถึง 0.005 ไมครอน ใช้กรองน้ำตาล สีย้อม แร่ธาตุ และช่วยลดแรงตึงผิว

3.4 Electrodialysis : เป็นการแยกองค์ประกอบที่มีประจุด้วยสารละลายอิเล็กโทรไลต์ โดยไอออนบวกจะเคลื่อนผ่านเมมเบรนอิออนบวก และไอออนลบจะเคลื่อนที่ผ่านเมมเบรนไอออนลบ เพื่อให้ได้สารละลายที่มีความเข้มข้นของไอออนสูงและสารละลายเจือจาง

2.8 ประโยชน์ของกรดมาลิค

2.8.1 อุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม กรดมาลิคได้รับการรับรองความปลอดภัยจากสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาของประเทศสหรัฐอเมริกา และถูกจัดให้เป็น Food-grade และสอดคล้องกับกฎหมาย FCC (Food chemical codex) (Goldberg และคณะ, 2006) ดังนั้นกรดมาลิคจึงได้รับความนิยมอย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่มต่างๆเพื่อใช้เป็นสารเติมแต่งกลิ่นรสให้มีความกลมกล่อมมากขึ้น ซึ่งเมื่อนำมาเทียบกับกรดซิตริคจะพบว่ากรดมาลิคมีรสชาติเปรี้ยวน้อยกว่ากรดซิตริคจึงทำให้เวลารับประทานมีรสชาติที่นุ่มนวลไม่บาดคอ (Archer และคณะ, 2008) และกรดมาลิคสามารถใช้เป็นสารให้ความหวานเทียมซึ่งออกฤทธิ์ร่วมกับแอสพาแทมที่เป็นสารให้ความหวานอยู่แล้วให้มีความหวานเพิ่มมากขึ้น ช่วยลดปริมาณการใช้แอสพาแทมลงได้ นอกจากนี้ในอุตสาหกรรมการผลิตไวน์มีการใช้กรดมาลิคควบคู่ไปกับกรดซิตริคและทาทาริคเพื่อเพิ่มความกลมกล่อมของรสชาติไวน์ ซึ่งกรดมาลิคที่ใช้ผลิตได้ทั้งจากการเมทาบอลิซึมของยีสต์ และการเมทาบอลิซึมของแบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดได้ (Swiegers และคณะ, 2005)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.8.2 อุตสาหกรรมเครื่องสำอางและยา ในด้านเภสัชกรรม กรดมาลิคมีหน้าที่ช่วยรักษาความผิดปกติของตับและภาวะผิดปกติที่เรียกว่า Hyperammonemia อีกทั้งยังช่วยเติมแต่งรสชาติของยาให้สามารถรับประทานได้ง่ายขึ้นด้วยและสำหรับอุตสาหกรรมเครื่องสำอางการเพิ่มกรดมาลิคในผลิตภัณฑ์จะช่วยทำให้ผลิตภัณฑ์มีกลิ่นหอมหวานมากขึ้น และในผลิตภัณฑ์ประเภทครีมกรดมาลิคถูกใช้เพื่อช่วยป้องกันและลดริ้วรอยก่อนวัย (Hronska และคณะ, 2015)

2.8.3 อุตสาหกรรมชุบโลหะ อยู่ในกลุ่มอุตสาหกรรมตกแต่งผิวโลหะ ซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับอุตสาหกรรมหลักอื่นๆมากมาย เช่น อุตสาหกรรมยานยนต์ อุตสาหกรรมอุปกรณ์เพื่อการก่อสร้าง เครื่องจักรกล เป็นต้น การชุบโลหะสามารถทำได้หลากหลายวิธี กรดมาลิคจึงมีบทบาทสำคัญในการเป็นสารชุบโลหะประเภทหนึ่งที่สามารถช่วยเพิ่มความแวววาวของผิวสัมผัส ช่วยยืดอายุการใช้งานและลดการผุกร่อนของผลิตภัณฑ์ได้ (Goldberg และคณะ, 2006)

2.8.4 อุตสาหกรรมโพลีเมอร์ เนื่องจากกรดมาลิคมีความคล้ายคลึงกับกรดโพลีแลคติคจึงสามารถนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพ โดยการนำกรดมาลิคมาผ่านกระบวนการโพลีเมอร์ไรเซชั่น (Polymerization) กลั่นในระบบสุญญากาศเพื่อเปลี่ยนโครงสร้างให้เป็นโพลีเมอร์ (Goldberg และคณะ, 2006) ที่มีชื่อว่า โพลีมาลิค (PMA) ซึ่งเป็นโพลีเมอร์ที่ย่อยสลายได้และถูกนำมาใช้ในด้านชีวการแพทย์ (Wei และคณะ, 2017)

2.8.5 การบำบัดน้ำเสียในโรงงานอุตสาหกรรม กรดมาลิคมีความเป็นกรดสูง ระหว่างโมเลกุลจะเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไฮโดรเจนที่แข็งแรง มีหมู่คาร์บอกซิลซึ่งสามารถสร้างคีเลต (Chelate) ที่เป็นสารช่วยจับไอออนของโลหะเพื่อดักจับโลหะหนักที่ปนเปื้อนในกระบวนการการบำบัดน้ำเสียได้ (Nayunigri และคณะ, 2016)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

3.1.1 กระบอกตวง
3.1.2 กระบอกน้ำกลั่น
3.1.3 ขวดบรรจุอาหาร (Duran)
3.1.4 ขวดรูปชมพู่ 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 ช้อนตักสาร
3.1.14 ตะเกียงแอลกอฮอล์
3.1.15 ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) ยี่ห้อ Contherm รุ่น Polar 1000 ประเทศนิวซีแลนด์
3.1.16 ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air flow) ยี่ห้อ Issco รุ่น BV T123 ประเทศสหรัฐอเมริกา
3.1.17 ตู้อบลมร้อน (Hot air oven) ยี่ห้อ Shel Lab รุ่น 1375 FX forced air oven ประเทศสหรัฐอเมริกา
3.1.18 ที่วางหลอดทดลอง (Rack) และหลอดทดลอง
3.1.19 แท่งแก้วคนสาร
3.1.20 บีกเกอร์
3.1.21 ปิเปต
3.1.22 ลูกยางดูดสาร
3.1.23 ลวดเขี่ยเชื้อ (loop)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 สารเคมี

3.2.1 Agar ยี่ห้อ Himedia ประเทศอินเดีย

3.2.2 Alcohol 70%

3.2.3 Alcohol 95%

3.2.4 Ammonium chloride (NH_4Cl) ยี่ห้อ Univar reagent ประเทศออสเตรเลีย

3.2.5 Ammonium sulphate $(NH_4)_2SO_4$ ยี่ห้อ Univar reagent ประเทศออสเตรเลีย

3.2.6 Calcium carbonate ($CaCO_3$) ยี่ห้อ Univar reagent ประเทศออสเตรเลีย

3.2.7 Calcium chloride dehydrate ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$) ยี่ห้อ Univar reagent ประเทศออสเตรเลีย

3.2.8 Calcium hydroxide ($Ca(OH)_2$) ยี่ห้อ Merck kGaA ประเทศเยอรมัน

3.2.9 Conc. Sulfuric acid (H_2SO_4 95-97%) ยี่ห้อ Univar reagent ประเทศออสเตรเลีย

3.2.10 Corn steep liquor ยี่ห้อ Sigma ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.2.11 3,5-Dinitrosalicylic acid (DNS) ยี่ห้อ Sigma-ALDRICH ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.2.12 Dipotassium hydrogenphosphate trihydrate ($K_2PO_4 \cdot 3H_2O$) ยี่ห้อ Fluka chemika ประเทศสวิสเซอร์แลนด์

3.2.13 Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) ยี่ห้อ Univar reagent ประเทศออสเตรเลีย

3.2.14 Feruous Sulfate Heptahydrate ($FeSO_4 \cdot 3H_2O$) ยี่ห้อ Fluka chemika ประเทศสวิสเซอร์แลนด์

3.2.15 Glucose ($C_6H_{10}O_6$) ยี่ห้อ Huakang ประเทศจีน

3.2.16 Glycerol ยี่ห้อ Fisher chemical ประเทศอังกฤษ

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

3.2.18 Magnesium sulfate heptahydrate ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) ยี่ห้อ Fluka Chemika ประเทศสวิสเซอร์แลนด์

3.2.19 Methanol ยี่ห้อ Honey well ประเทศเกาหลี

3.2.20 Manganaese (II) sulphate ($MgSO_4$) ยี่ห้อ Univar reagent ประเทศออสเตรเลีย

3.2.21 Phenol crystallized 99% ยี่ห้อ Panreac ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.2.22 Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4) ยี่ห้อ CARLO ERBA Reagemt ประเทศอิตาลี

3.2.23 Potassium sodium (+) – Tartrate ($KNaC_4H_4O_6 \cdot 4H_2O$) ยี่ห้อ Univar reagent ประเทศออสเตรเลีย

3.2.24 Sodium chloride (NaCl) ยี่ห้อ Univar reagent ประเทศออสเตรเลีย

3.2.25 Sodium hydroxide (NaOH) ยี่ห้อ Univar reagent ประเทศออสเตรเลีย

3.2.26 Sodium nitrate ($NaNO_3$) ยี่ห้อ Univar reagent ประเทศออสเตรเลีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.27 Sucrose ยี่ห้อ Univar reagent ประเทศออสเตรเลีย

3.2.28 Xylose ($C_5H_{10}O_5$) ยี่ห้อ Huakang ประเทศจีน

3.2.29 Yeast extract ยี่ห้อ Scharlau Microbiology ประเทศอังกฤษ

3.2.30 Zinc sulfate ($ZnSO_4$) ยี่ห้อ Univar reagent ประเทศออสเตรเลีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 วิธีดำเนินงานวิจัย

3.3.1 แบคทีเรียที่ถูกคัดเลือกมาใช้ในการศึกษาการผลิตกรดมาลิคโดยใช้ไซโลสหรือกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน

จากการศึกษาก่อนหน้านี้ (ประภัสสร เทพกัณฑ์ และสุพรรณิกา ยอดสง่า, 2557) ทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่คัดแยกได้ในอาหารเหลวสูตร Shaker culture medium (Tabuchi และคณะ, 1981) โดยใช้แหล่งคาร์บอนร้อยละ 10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และเติมแคลเซียมคาร์บอเนต ร้อยละ 1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ทำการเพาะเลี้ยงที่สภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบแบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดมาลิคได้ คือ ไอโซเลต DG2 ซึ่งคัดแยกได้จากองุ่น ผลิตกรดมาลิคได้สูงสุด 55.120 กรัมต่อลิตร โดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน และไอโซเลต FX1 ซึ่งคัดแยกได้จากบ่อบำบัดน้ำเสียสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง สามารถผลิตกรดมาลิคได้ 34.025 กรัมต่อลิตร โดยใช้ไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอนดังนั้น จึงเลือกแบคทีเรียทั้ง 2 ไอโซเลตนี้สำหรับศึกษาในครั้งนี้

3.3.2 อาหารสำหรับใช้ศึกษาการผลิตกรดมาลิคโดยไอโซเลต DG2 และ FX1

3.3.2.1 อาหารเหลว Basic medium (Li และคณะ, 2014)

ประกอบด้วย

Xylose/Glucose	100	กรัมต่อลิตร
KH_2PO_4	0.8	กรัมต่อลิตร
$(NH_4)_2SO_4$	2	กรัมต่อลิตร
$MgSO_4$	0.3	กรัมต่อลิตร
$ZnSO_4$	0.2	กรัมต่อลิตร
$CaCO_3$	30	กรัมต่อลิตร

3.3.2.2 อาหารเหลว Calcium malate production (Khan และคณะ, 2014)

ประกอบด้วย

Xylose/Glucose	100	กรัมต่อลิตร
KH_2PO_4	0.1	กรัมต่อลิตร
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.1	กรัมต่อลิตร
KCl	0.5	กรัมต่อลิตร
Corn steep liquor	0.5	ร้อยละโดยปริมาตร
$CaCO_3$	30	กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.2.3 อาหารเหลว Main culture (Ochsenreither และคณะ, 2014)

ประกอบด้วย

Xylose/Glucose	100	กรัมต่อลิตร
KH_2PO_4	0.1	กรัมต่อลิตร
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.1	กรัมต่อลิตร
$(NH_4)_2SO_4$	1.2	กรัมต่อลิตร
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	60	กรัมต่อลิตร
$K_2PO_4 \cdot 3H_2O$	0.17	กรัมต่อลิตร
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.1	กรัมต่อลิตร
NaCl	5	กรัมต่อลิตร
$CaCO_3$	30	กรัมต่อลิตร

3.3.2.4 อาหารเหลว Production medium (Zhang และคณะ, 2011)

ประกอบด้วย

Xylose/Glucose	100	กรัมต่อลิตร
KH_2PO_4	0.1	กรัมต่อลิตร
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.1	กรัมต่อลิตร
KCl	0.5	กรัมต่อลิตร
$NaNO_3$	2	กรัมต่อลิตร
$CaCO_3$	30	กรัมต่อลิตร

3.3.2.5 อาหารเหลว Shaker culture (Tabushi และคณะ, 1981)

ประกอบด้วย

Xylose/Glucose	100	กรัมต่อลิตร
Yeast extract	1	กรัมต่อลิตร
KH_2PO_4	0.5	กรัมต่อลิตร
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.5	กรัมต่อลิตร
NH_4Cl	3	กรัมต่อลิตร
$CaCO_3$	30	กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.3 การเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้น

ทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียไอโซเลต DG2 และ FX1 ที่สามารถผลิตมาลิคได้ในอาหารเหลว Selective medium (ประกอบด้วย Glucose/Xylose ร้อยละ 10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร, Yeast extract ร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร, KH_2PO_4 ร้อยละ 0.1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ร้อยละ 0.05 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และ $CaCO_3$ ร้อยละ 1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (Tabushi และคณะ, 1981) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่สภาวะเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที สังเกตการเปลี่ยนแปลงจนกระทั่งแคลเซียมคาร์บอเนตลดลงหรือหมดไป จากนั้นถ่ายเชื้อแบคทีเรียลงในอาหารเหลว Selective medium ปริมาตร 60 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ทำการเพาะเลี้ยงที่สภาวะเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ให้หัวเชื้อเริ่มต้นมีค่าการดูดกลืนแสงมากกว่าหรือเท่ากับ 0.5 ขึ้นไปเพื่อใช้เป็นหัวเชื้อสำหรับการเพาะเลี้ยงต่อไป

3.3.4 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมบางประการต่อการผลิตกรดมาลิค

3.3.4.1 ผลของชนิดอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดมาลิค

นำหัวเชื้อจากข้อ 3.3.3 ร้อยละ 5 โดยปริมาตร เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว 5 สูตร ดังข้อ 3.3.2 โดยใช้อาหาร Shaker culture เป็นสูตรอาหารควบคุมและใช้ปริมาณแหล่งคาร์บอน 100 กรัมต่อลิตร และปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนต 30 กรัมต่อลิตร นำไปเพาะเลี้ยงที่สภาวะเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นเก็บตัวอย่างเป็นเวลา 5-6 วัน โดยไอโซเลต DG2 ใช้เวลาในการเพาะเลี้ยง 5 วัน ส่วนไอโซเลต FX1 ใช้เวลาในการเพาะเลี้ยง 6 วัน และตัวอย่างที่ได้นั้น นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 9,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกส่วนที่เป็นตะกอนเซลล์และแคลเซียมคาร์บอเนตออก หลังจากนั้นนำส่วนใสไปวิเคราะห์หาปริมาณแคลเซียมมาเลตด้วยวิธีการไทเทรต ตรวจสอบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS และตรวจสอบพีเอชด้วยเครื่องวัดพีเอช (pH meter) เพื่อศึกษาสูตรอาหารที่ให้ปริมาณกรดมาลิคที่อยู่ในรูปแคลเซียมมาเลตสูงที่สุด

3.3.4.2 ผลของอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดมาลิค

จากการศึกษาผลของชนิดของอาหารที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียเพื่อผลิตกรดมาลิคให้ได้ปริมาณสูงที่สุดแล้ว จากนั้นนำชนิดของอาหารที่สามารถผลิตกรดมาลิคได้สูงที่สุด 30 มิลลิลิตร มาทำการศึกษาผลของอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียเพื่อผลิตกรดมาลิค โดยใช้หัวเชื้อร้อยละ 5 โดยปริมาตร ใช้แหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร และปรับปริมาณแหล่งไนโตรเจนต่างๆ โดยไอโซเลต DG2 เพาะเลี้ยงในอาหาร Basic medium ที่ใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนปริมาณ 100 กรัมต่อลิตร และปรับปริมาณแหล่งคาร์บอนต่อไนโตรเจน เท่ากับ 50:1 75:1 100:1 125:1 150:1 และ 200:1 โดยใช้ $(NH_4)_2SO_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจนปริมาณ 4, 2.6, 2, 1.6, 1.3 และ 1 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ สำหรับไอโซเลต FX1 เพาะเลี้ยงในอาหาร Calcium malate production ที่ใช้น้ำตาลไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอนปริมาณ 100 กรัมต่อลิตร และปรับปริมาณแหล่งคาร์บอนต่อไนโตรเจน เท่ากับ 10:1 20:1 30:1 40:1 50:1 และ 100:1 โดยใช้ Corn steep liquor เป็นแหล่งไนโตรเจนปริมาณ 13, 6.67, 5,

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.34, 2.67 และ 1.34 มิลลิลิตรต่อลิตร เพื่อให้ผลิตกรดมาลิคได้สูงขึ้น หลังจากนั้นเก็บตัวอย่างเป็นเวลา 5-6 วัน โดย ไอโซเลต DG2 ใช้เวลาในการเพาะเลี้ยง 5 วัน ส่วนไอโซเลต FX1 ใช้เวลาในการเพาะเลี้ยง 6 วัน และตัวอย่างที่ได้นั้น นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 9,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกส่วนที่เป็นตะกอนเซลล์และแคลเซียมคาร์บอเนตออก หลังจากนั้นนำส่วนใสไปวิเคราะห์หาปริมาณแคลเซียมมาเลตด้วยวิธีการไทเทรต ตรวจสอบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS และตรวจสอบพีเอชด้วยเครื่องวัดพีเอช (pH meter) เพื่อศึกษาอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่ให้ปริมาณกรดมาลิคที่อยู่ในรูปแคลเซียมมาเลตสูงที่สุด

3.3.4.3 ผลของชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดมาลิค

จากการศึกษาผลของชนิดของอาหารที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียเพื่อผลิตกรดมาลิคให้ได้ปริมาณสูงที่สุดแล้ว จากนั้นนำชนิดของอาหารที่สามารถผลิตกรดมาลิคได้สูงที่สุด 30 มิลลิลิตร มาใช้ในการศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียเพื่อให้ผลิตกรดมาลิคได้ปริมาณเพิ่มสูงขึ้น 30 มิลลิลิตร เติมหัวเชื้อร้อยละ 5 โดยปริมาตร ใช้แหล่งคาร์บอนต่างชนิดกัน ได้แก่ กลูโคส ไซโลส กลีเซอรอล ซูโครส โมลาสและโมลาส (กำจัดพิษ) ตามลำดับ หลังจากนั้นเก็บตัวอย่างเป็นเวลา 5-6 วัน โดย ไอโซเลต DG2 ใช้เวลาในการเพาะเลี้ยง 5 วัน ส่วนไอโซเลต FX1 ใช้เวลาในการเพาะเลี้ยง 6 วัน และตัวอย่างที่ได้นั้น นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 9,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกส่วนที่เป็นตะกอนเซลล์และแคลเซียมคาร์บอเนตออก หลังจากนั้นนำส่วนใสไปวิเคราะห์หาปริมาณแคลเซียมมาเลตด้วยวิธีการไทเทรต ตรวจสอบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS ตรวจสอบปริมาณน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธี ฟีนอลซัลฟิวริค และตรวจสอบพีเอชด้วยเครื่องวัดพีเอช (pH meter) เพื่อศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่ให้ปริมาณกรดมาลิคที่อยู่ในรูปแคลเซียมมาเลตสูงที่สุด

3.3.5 การตรวจสอบหาปริมาณน้ำตาล

3.3.5.1 การตรวจสอบหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS (Miller, 1959)

3.3.5.1.1 เตรียมสารละลาย Blank เติมน้ำกลั่นลงในหลอดทดลอง 0.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลาย DNS ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที ทำให้เย็นลงทันที แล้วเติมน้ำกลั่นปริมาตร 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้า นำไปตั้งค่าการดูดกลืนแสงให้เป็นศูนย์ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

3.3.5.1.2 เตรียมสารละลายมาตรฐานของไซโลสหรือกลูโคสที่ความเข้มข้น 0, 200, 400, 600, 800 และ 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลาย DNS ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที ทำให้เย็นลงทันที แล้วเติมน้ำกลั่นปริมาตร 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร จากนั้นนำค่าที่ได้ไปสร้างกราฟมาตรฐานของไซโลสหรือกลูโคสที่ความเข้มข้นต่างๆ

3.3.5.1.3 วัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ โดยนำตัวอย่างน้ำเลี้ยง ที่เก็บในแต่ละวัน ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลาย DNS ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที ทำให้เย็นลงทันที แล้วเติมน้ำกลั่นปริมาตร 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของกลูโคสหรือไซโลสแล้วคำนวณหาปริมาณน้ำตาลที่เหลือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.5.2 การตรวจสอบหาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธีฟีนอลซัลฟิวริค (Dubois, 1956)

3.3.5.2.1 เตรียมสารละลาย Blank โดยการเติมน้ำกลั่นลงในหลอดทดลอง 1 มิลลิลิตร มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายฟีนอลปริมาตร 1 มิลลิลิตร หลังจากนั้นเติมกรดซัลฟิวริค 5 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่า และทำให้เย็นในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส นำไปตั้งค่าการดูดกลืนแสงให้เป็นศูนย์ที่ความยาวคลื่น 480 นาโนเมตร และ 490 นาโนเมตร

3.3.5.2.2 เตรียมสารละลายมาตรฐานของไซโลสหรือกลูโคสที่ความเข้มข้น 0, 20, 40, 60, 80 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลาย ฟีนอล 1 มิลลิลิตร หลังจากนั้นเติมกรดซัลฟิวริค 5 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที เขย่าให้เข้ากัน และทำให้เย็นลงด้วยอ่างควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส สารละลายมาตรฐานของไซโลสนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 480 นาโนเมตร ส่วนสารละลายมาตรฐานของกลูโคสนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร จากนั้นนำค่าที่ได้ไปสร้างกราฟมาตรฐานของไซโลสหรือกลูโคสที่ความเข้มข้นต่างๆ

3.3.5.2.3 วัดปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ โดยนำตัวอย่างน้ำเลี้ยงเก็บในชั่วโมงที่ 0 และชั่วโมงสุดท้ายของการเพาะเลี้ยงปริมาตร จากนั้นเติมสารละลายฟีนอลปริมาตร 1 มิลลิลิตร หลังจากนั้นเติมกรดซัลฟิวริค 5 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 10 นาที เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่า และทำให้เย็นในอ่างควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 480 นาโนเมตร โดยใช้น้ำตาลไซโลสเป็นสารละลายมาตรฐาน และที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร โดยใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นสารละลายมาตรฐาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.6 การตรวจสอบหาปริมาณแคลเซียมมาเลต

3.3.6.1 การตกตะกอนแคลเซียมมาเลตด้วยเมทานอล (Wang และคณะ, 2013)

นำน้ำเลี้ยงของแต่ละไอโซเลต 100 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 7000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 5 นาที เพื่อตกตะกอนเซลล์และแคลเซียมคาร์บอเนตที่ยังเหลืออยู่ออกไป จากนั้นนำส่วนใสเติมเมทานอลปริมาตร 50 มิลลิลิตร เพื่อกำจัดเอ็กโซโพลีแซ็คคาไรด์ และนำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งหนึ่งที่ความเร็วรอบ 7000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 5 นาที จากนั้นนำส่วนใสที่ได้เติมเมทานอลปริมาตร 300 มิลลิลิตรเพื่อตกตะกอนแคลเซียมมาเลต บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ข้ามคืน แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 7000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 5 นาทีและนำตะกอนที่ได้อบที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมง ตะกอนที่ได้นำไปวิเคราะห์หาปริมาณแคลเซียมมาเลตด้วยวิธีการไทเทรตต่อไป

3.3.6.2 การหาปริมาณแคลเซียมมาเลตด้วยวิธีการไทเทรต (FAO, 2006)

นำตะกอนที่ผ่านการอบแล้วที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียสปริมาณ 0.4 กรัม เติมลงในสารผสมระหว่างน้ำกลั่นปริมาตร 10 มิลลิลิตร และกรดไฮโดรคลอริคความเข้มข้น 2.7 โมลาร์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร จากนั้นเติมน้ำกลั่นลงไปให้ได้สารละลายปริมาตร 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ก่อนจะเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1.075 โมลาร์ ปริมาตร 15 มิลลิลิตร และเติมไฮโดรฟีนอลบลู (Hydrophenolblue) ประมาณ 2-3 หยดเป็นอินดิเตอร์ จากนั้นนำไปไทเทรตด้วยสารละลาย Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ จนกระทั่งถึงจุดยุติ แล้วนำปริมาตร Ethylenediaminetetraacetic acid ที่ใช้ในการไทเทรตมาคำนวณหาปริมาณของแคลเซียมมาเลตที่ผลิตได้ดังสมการ

EDTA 1 มิลลิลิตร	=	แคลเซียมมาเลต 8.607 มิลลิกรัม

3.3.7 การกำจัดสารพิษออกจากกากน้ำตาล (Cheng และคณะ, 2017)

3.3.7.1 ในกากน้ำตาลจะมีปริมาณน้ำตาลทั้งหมด 500 กรัมต่อลิตร ต้องการให้กากน้ำตาลมีปริมาณน้ำตาลทั้งหมด 100-270 กรัมต่อลิตร จึงชั่งปริมาณกากน้ำตาล 108 กรัม และเติมน้ำลงไป 92 มิลลิลิตร จะได้ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ต้องการจะนำไปกำจัดสารพิษ

3.3.7.2 จากนั้นนำกากน้ำตาลจากข้อ 3.3.7.1 มาปรับด้วยกรดซัลฟิวริคความเข้มข้น 3 โมลาร์ ให้ได้พีเอช 3.0 และนำไปต้มที่อุณหภูมิ 60-70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 7000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 40 นาที นำส่วนใสที่ได้มาปรับด้วยแคลเซียมไฮดรอกไซด์ให้ได้พีเอช 6.0 และนำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็วรอบ 7000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 40 นาที หลังจากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนที่จะนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

จากการศึกษาก่อนหน้านี้ (ประภัสสร เทพกัณฑ์ และสุพรรณิกา ยอดสง่า, 2557) ทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่คัดแยกได้ในอาหารเหลวสูตร Shaker culture medium (Tabuchi และคณะ, 1981) โดยใช้แหล่งคาร์บอนร้อยละ 10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และเติมแคลเซียมคาร์บอเนต ร้อยละ 1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ทำการเพาะเลี้ยงที่สภาวะเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบแบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดมาลิคได้ คือ ไอโซเลต DG2 ซึ่งคัดแยกได้จากองุ่นผลิตกรดมาลิคได้สูงสุด 55.12 กรัมต่อลิตร โดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน และไอโซเลต FX1 คัดแยกได้จากบ่อบำบัดน้ำเสียสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ผลิตกรดมาลิคได้ 34.03 กรัมต่อลิตร โดยใช้ไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอน จึงเลือกแบคทีเรียทั้ง 2 ไอโซเลตนี้สำหรับศึกษาในครั้งนี้

4.1 การศึกษาผลของชนิดอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดมาลิค

4.1.1 การศึกษาผลของชนิดอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดมาลิคของไอโซเลต DG2

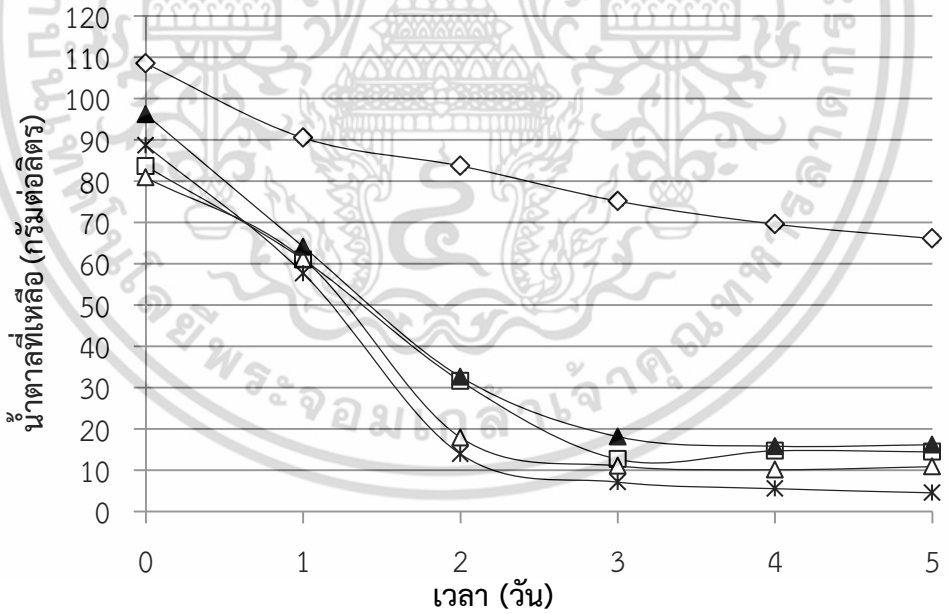
ทำการศึกษาโดยใช้สูตรอาหารทั้งหมด 5 ชนิด คือ อาหารสูตร Basic medium (Li และคณะ, 2014) อาหารสูตร Calcium malate production (Khan และคณะ, 2014) อาหารสูตร Main culture (Ochsenreither และคณะ, 2014) อาหารสูตร Production medium (Zhang และคณะ, 2011) และอาหารสูตร Shaker culture (Tabushi และคณะ, 1981) เป็นสูตรอาหารควบคุม จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสาร Building Blocks (ชัชษฎาภา และคณะ, 2558) พบว่าการใช้ปริมาณแหล่งคาร์บอน 100 กรัมต่อลิตร และปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนต 30 กรัมต่อลิตรเหมาะสมต่อการผลิตกรดมาลิคของทั้งสองไอโซเลตนี้ ดังนั้นในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมบางประการต่อการผลิตกรดมาลิคจึงใช้ปริมาณแหล่งคาร์บอนเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร และใช้ปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนต 30 กรัมต่อลิตร และเติมหัวเชื้อร้อยละ 5 โดยปริมาตร ซึ่งมีค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรเท่ากับ 0.748 นำไปเลี้ยงที่สภาวะเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นเก็บตัวอย่างทุกๆวันเป็นระยะเวลาทั้งสิ้น 5 วัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 9,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกตะกอนเซลล์ และแคลเซียมคาร์บอเนตออก เนื่องจากหมู่ฟังก์ชันของกรดมาลิคที่ผลิตได้มีการจับกับแคลเซียมคาร์บอเนตในอาหาร ผลผลิตที่ได้จึงอยู่ในรูปของแคลเซียมมาเลต (Khan และคณะ, 2014) ดังนั้นจึงนำส่วนใสที่ได้มาวิเคราะห์หาปริมาณแคลเซียมมาเลตด้วยวิธีการไทเทรต ตรวจสอบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS และตรวจสอบพีเอชด้วยเครื่องวัดพีเอช (pH meter) ผลการทดลองที่ได้แสดงดังตารางที่ 4.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 แสดงปริมาณแคลเซียมมาเลต ผลได้ และพีเอชจากการเพาะเลี้ยงไอโซเลต DG2 ในสูตรอาหารที่แตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 5 วัน

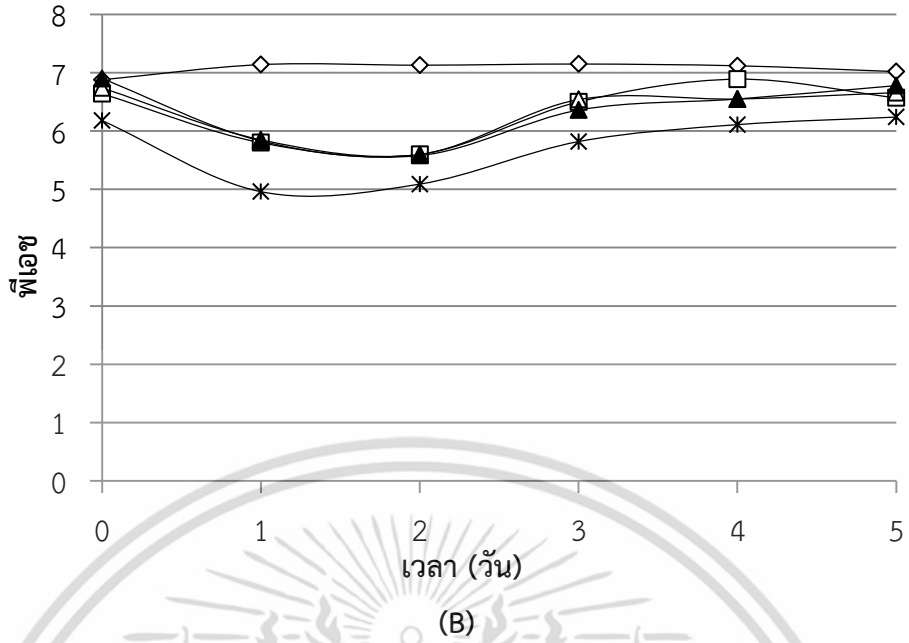
Isolate	Medium	Quantity of Calcium malate (g/l)	Yield (mol/mol)	Final pH
DG2	Basic medium	50.66±0.38	0.63±0.00	5.5
	Calcium malate production	39.78±0.31	0.60±0.00	6.7
	Main culture	40.45±0.32	0.61±0.00	6.9
	Production medium	38.99±0.00	0.51±0.00	6.9
	Shaker culture	19.49±0.00	0.49±0.00	7.2

จากตารางที่ 4.1 แสดงปริมาณแคลเซียมมาเลต และผลได้เมื่อเพาะเลี้ยงไอโซเลต DG2 ในสูตรอาหารที่แตกต่างกัน ได้แก่ อาหารสูตร Basic medium, Calcium malate production, Main culture, Production medium และ Shaker culture นอกจากนี้ได้มีการเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลที่เหลือ และพีเอชของไอโซเลต DG2 ที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารต่างๆ เป็นระยะเวลา 5 วัน ดังรูปที่ 4.1 และเปรียบเทียบปริมาณแคลเซียมมาเลตที่ผลิตได้และผลได้ของอาหารแต่ละชนิด ดังรูปที่ 4.2



(A)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



(B)

รูปที่ 4.1 แสดงปริมาณน้ำตาลที่เหลือ (A) และพีเอช (B) ของไอโซเลต DG2 ณ เวลาต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร Basic medium, Calcium malate production, Main culture, Production medium, และ Shaker culture

โดย ✳ คือ อาหาร Basic medium
△ คือ อาหาร Calcium malate production
□ คือ อาหาร Main culture
▲ คือ อาหาร Production medium
◇ คือ อาหาร Shaker culture

จากรูปที่ 4.1 (A) แสดงปริมาณน้ำตาลที่เหลือ และรูปที่ 4.1 (B) แสดงค่าพีเอชของไอโซเลต DG2 ณ เวลาต่างๆ โดยเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร Basic medium, Calcium malate production, Main culture, Production medium และ Shaker culture และใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร พบว่า เมื่อใช้อาหาร Basic medium ในการเพาะเลี้ยงปริมาณน้ำตาลกลูโคสลดลงอย่างรวดเร็วในวันที่ 1 และ 2 และค่อยๆ ลดลงจนถึงวันที่ 5 เหลือปริมาณน้ำตาลกลูโคสอยู่ 4.49±0.12 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 4.1 (A), ✳) ซึ่งมีปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือต่ำสุดเมื่อเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือกับอาหารชนิดอื่นๆ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Ma และคณะ (2013) ที่กล่าวว่าปริมาณน้ำตาลที่ลดลงอาจเกิดจากแบคทีเรียนำน้ำตาลไปใช้ในการเจริญ สร้างกรดอินทรีย์ และสารเมตาบอไลต์ต่างๆ ขณะที่ค่าพีเอชลดลงต่ำสุดในวันที่ 1 และค่อนข้างคงที่ถึงวันที่ 2 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Dave และ Patel (2003) ที่กล่าวว่าการลดลงของค่าพีเอชนั้นมีความสัมพันธ์ต่อการผลิตกรดอินทรีย์เพิ่มขึ้น และพบว่าค่าพีเอชค่อยๆเพิ่มขึ้นในวันที่ 3 และคงที่จนถึงวันที่ 5 ซึ่งแสดงถึงการเพิ่มขึ้นของแคลเซียมมาเลต เนื่องจากแคลเซียมมาเลตมีค่าพีเอชประมาณ 5.5-6.5 (Schell, 1997) และมีค่าพีเอชต่ำสุดเมื่อเปรียบเทียบกับอาหารชนิดอื่นๆ ซึ่งมีค่าพีเอชเท่ากับ 5.5 (รูปที่ 4.1 (B), ✳)

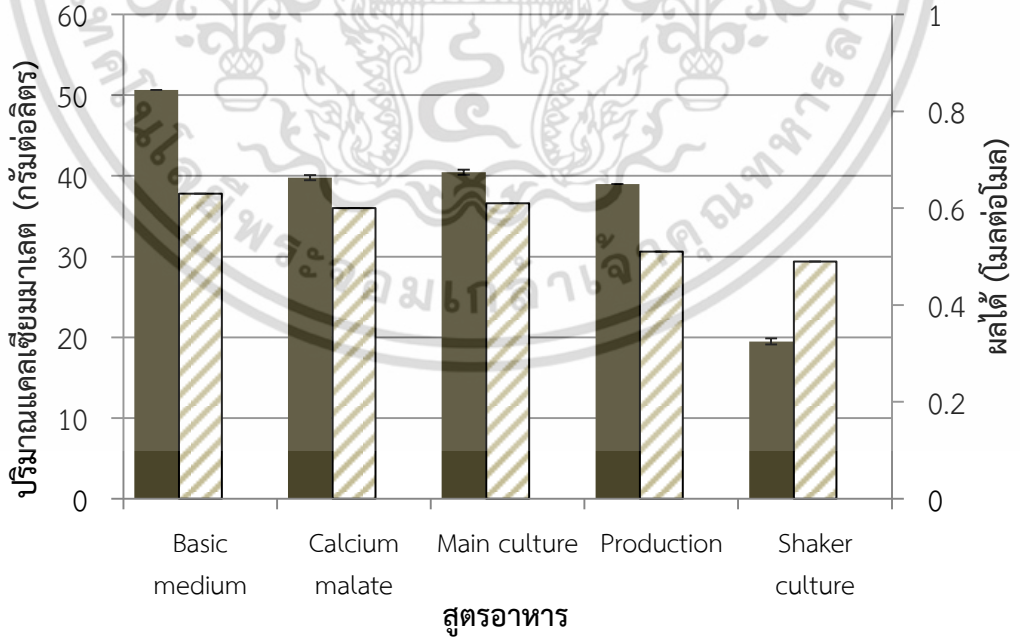
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อเพาะเลี้ยงไอโซเลต DG2 ในอาหาร Calcium malate production พบว่ามีปริมาณน้ำตาลกลูโคสลดลงอย่างต่อเนื่องตั้งแต่วันที่ 1 ถึงวันที่ 3 และค่อนข้างคงที่จนถึงวันที่ 5 เหลือปริมาณน้ำตาลกลูโคสอยู่ 10.58±0.33 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 4.1 (A),) ขณะที่ค่าพีเอชลดลงจนถึงวันที่ 2 และค่อยๆเพิ่มขึ้นในวันที่ 3 และค่อนข้างคงที่จนถึงวันที่ 5 ซึ่งมีค่าพีเอชเท่ากับ 6.7 (รูปที่ 4.1 (B),)

เมื่อเพาะเลี้ยงไอโซเลต DG2 ในอาหาร Main culture พบว่ามีปริมาณน้ำตาลกลูโคสลดลงอย่างต่อเนื่องตั้งแต่วันที่ 1 ถึงวันที่ 3 และค่อนข้างคงที่จนถึงวันที่ 5 เหลือปริมาณน้ำตาลกลูโคสอยู่ 14.41±0.88 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 4.1 (A),) ขณะที่ค่าพีเอชลดลงต่ำสุดจนถึงวันที่ 2 และค่อยๆเพิ่มขึ้นในวันที่ 3 หลังจากนั้นเพิ่มขึ้นเล็กน้อยจนถึงวันที่ 5 ซึ่งมีค่าพีเอชเท่ากับ 6.9 (รูปที่ 4.1 (B),)

เมื่อเพาะเลี้ยงไอโซเลต DG2 ในอาหาร Production medium พบว่ามีปริมาณน้ำตาลกลูโคสลดลงอย่างรวดเร็วในวันที่ 1 และ 2 และค่อยๆลดลงในวันที่ 3 และค่อนข้างคงที่จนถึงวันที่ 5 เหลือปริมาณน้ำตาลกลูโคสอยู่ 16.14±0.19 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 4.1 (A),) ขณะที่ค่าพีเอชลดลงต่ำสุดจนถึงวันที่ 2 และค่อยๆเพิ่มขึ้นในวันที่ 3 จากนั้นค่อนข้างคงที่จนถึงวันที่ 5 ซึ่งมีค่าพีเอชเท่ากับ 6.9 (รูปที่ 4.1 (B),)

เมื่อเพาะเลี้ยงไอโซเลต DG2 ในอาหาร Shaker culture พบว่ามีปริมาณน้ำตาลกลูโคสลดลงทีละน้อยอย่างต่อเนื่องตั้งแต่วันที่ 1 ถึงวันที่ 5 เหลือปริมาณน้ำตาลกลูโคสอยู่ 66.09±0.84 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 4.1 (A),) ขณะที่ค่าพีเอชคงที่ตั้งแต่วันที่ 1 จนถึงวันที่ 5 ซึ่งมีค่าพีเอชเท่ากับ 7.2 (รูปที่ 4.1 (B),) ซึ่งอาจเกิดจากเซลล์ปรับตัวได้ช้า และอาจทำให้เซลล์สามารถเจริญเติบโตได้อย่างช้าๆและผลิตกรดอินทรีย์ได้ในปริมาณน้อยอีกด้วย



รูปที่ 4.2 แสดงปริมาณแคลเซียมมาเลตที่ผลิตได้ และผลได้ของไอโซเลต DG2 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรต่างๆ เป็นระยะเวลา 5 วัน โดย ■ คือปริมาณแคลเซียมมาเลตที่ผลิตได้ และ ▨ คือผลได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากรูปที่ 4.2 แสดงปริมาณแคลเซียมมาเลตที่ผลิตได้ และผลได้ของไอโซเลต DG2 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร Basic medium, Calcium malate, Production medium, Main culture และ Shaker culture พบว่าไอโซเลต DG2 สามารถผลิตแคลเซียมมาเลตได้สูงสุด 50.66±0.38 กรัมต่อลิตร และได้ค่าผลได้ (Yield) สูงสุดเท่ากับ 0.63±0.00 โมลต่อโมล เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร Basic medium ดังนั้นอาหาร Basic medium จึงมีความเหมาะสมต่อการผลิตกรดมาลิคของไอโซเลต DG2 และเมื่อพิจารณาค่าผลได้ พบว่ามีค่าผลได้สูงกว่างานวิจัยของ Moon และคณะ (2008) ที่รายงานว่า *E. coli* สายพันธุ์กลายสามารถผลิตกรดมาลิคซึ่งมีค่าผลได้ คือ 0.56±0.03 โมลต่อโมล โดยใช้กลูโคสปริมาณ 20 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน

4.1.2 การศึกษาผลของชนิดอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดมาลิคของไอโซเลต FX1

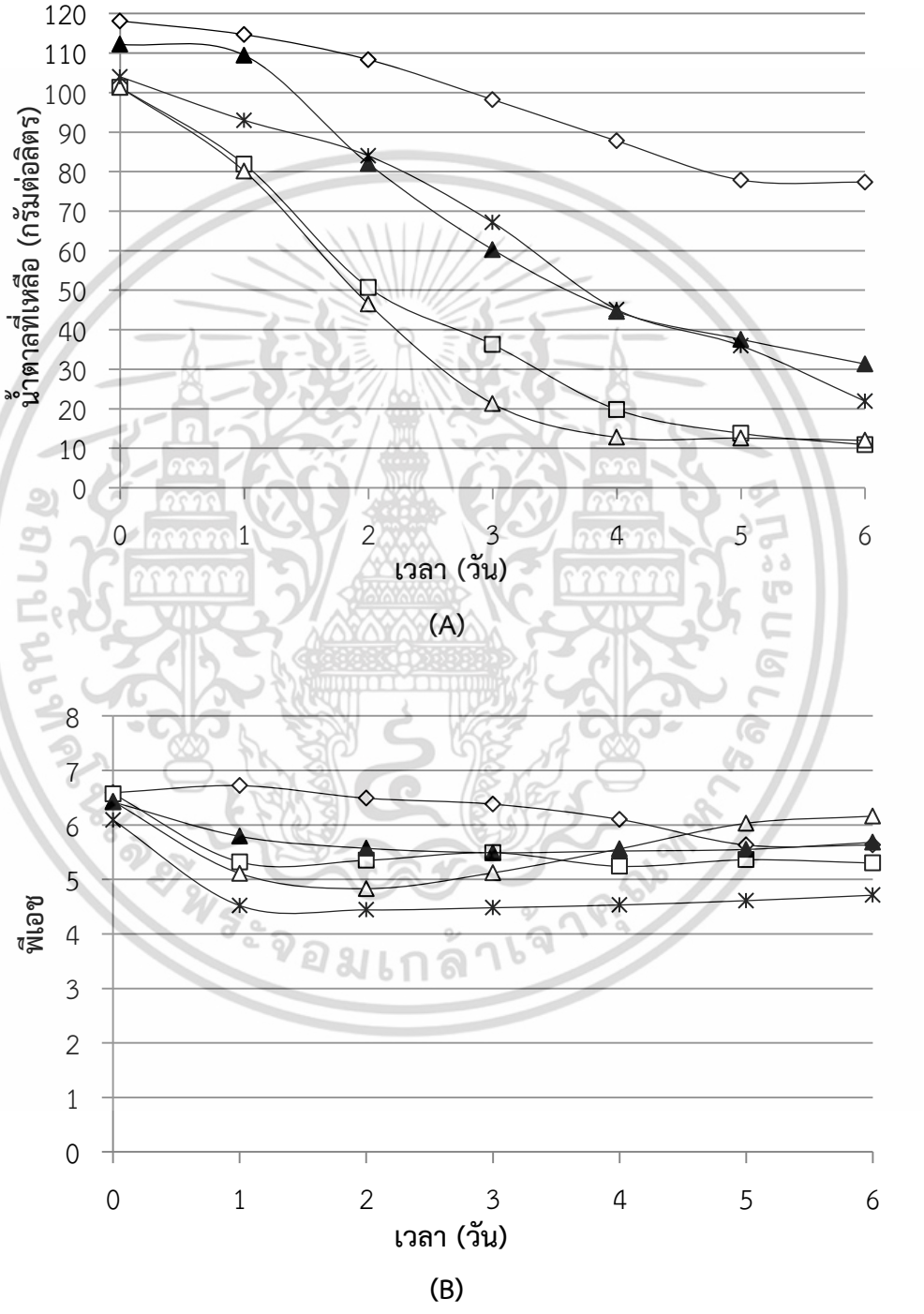
ทำการศึกษาโดยใช้สูตรอาหารทั้งหมด 5 ชนิด คือ อาหารสูตร Basic medium (Li และคณะ, 2014) อาหารสูตร Calcium malate production (Khan และคณะ, 2014) อาหารสูตร Main culture (Ochsenreither และคณะ, 2014) อาหารสูตร Production medium (Zhang และคณะ, 2011) และอาหารสูตร Shaker culture (Tabushi และคณะ, 1981) เป็นสูตรอาหารควบคุม จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสาร Building Blocks (ชัชษฎาภา และคณะ, 2558) พบว่าการใช้ปริมาณแหล่งคาร์บอน 100 กรัมต่อลิตร และปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนต 30 กรัมต่อลิตร เหมาะสมต่อการผลิตกรดมาลิคของไอโซเลต FX1 ที่สุด ดังนั้นในการศึกษานี้จึงใช้ปริมาณแหล่งคาร์บอน 100 กรัมต่อลิตร และปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนต 30 กรัมต่อลิตร และเติมหัวเชื้อร้อยละ 5 โดยปริมาตร ซึ่งมีค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรเท่ากับ 0.894 นำไปเพาะเลี้ยงที่สภาวะเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นเก็บตัวอย่างทุกๆวันเป็นระยะเวลา 6 วัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 9,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกตะกอนเซลล์ และแคลเซียมคาร์บอเนตออก นำส่วนใสที่ได้มาวิเคราะห์หาปริมาณแคลเซียมมาเลตด้วยวิธีการไทเทรต ตรวจสอบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS และตรวจสอบพีเอชด้วยเครื่องวัดพีเอช (pH meter) ผลการทดลองที่ได้แสดงดังตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 แสดงปริมาณแคลเซียมมาเลต ผลได้ และพีเอชจากการเพาะเลี้ยงไอโซเลต FX1 ในสูตรอาหารที่แตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 6 วัน

Isolate	Medium	Quantity of Calcium malate (g/l)	Yield (mol/mol)	Final pH
FX1	Basic medium	38.47±1.75	0.41±0.2	4.7
	Calcium malate production	50.84±0.71	0.50±0.01	6.2
	Main culture	26.42±1.23	0.15±0.01	5.3
	Production medium	11.64±0.00	0.13±0.00	5.7
	Shaker culture	19.75±0.45	0.34±0.01	5.6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากตารางที่ 4.2 แสดงปริมาณแคลเซียมมาเลต และผลได้เมื่อเพาะเลี้ยงไอโซเลต FX1 ในสูตรอาหารที่แตกต่างกัน ได้แก่ อาหารสูตร Basic, Calcium malate production, Main culture, Production และ Shaker culture นอกจากนี้ได้มีการเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลที่เหลือ และพีเอชของไอโซเลต FX1 ที่ทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 6 วัน ดังรูปที่ 4.3 และเปรียบเทียบปริมาณแคลเซียมมาเลตที่ผลิตได้และผลได้ของอาหารแต่ละชนิด ดังรูปที่ 4.4



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 4.3 แสดงปริมาณน้ำตาลที่เหลือ (A) และพีเอช (B) ของไอโซเลต FX1 ณ เวลาต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร Basic medium, Calcium malate production, Main culture, Production medium, และ Shaker culture

โดย คือ อาหาร Basic medium

คือ อาหาร Calcium malate production

คือ อาหาร Main culture

คือ อาหาร Production medium

คือ อาหาร Shaker culture

จากรูปที่ 4.3 (A) แสดงปริมาณน้ำตาลที่เหลือ และรูปที่ 4.3 (B) แสดงพีเอชของไอโซเลต FX1 ณ เวลาต่างๆ โดยเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร Basic medium, Calcium malate production, Main culture, Production medium และ Shaker culture และใช้ไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอนความเข้มข้นเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงไอโซเลต FX1 ในอาหาร Basic medium มีปริมาณน้ำตาลไซโลสค่อนข้างลดลงอย่างต่อเนื่องจนถึงวันที่ 6 เหลือน้ำตาลไซโลสอยู่ 21.89±0.17 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 4.3 (A),) ขณะที่ค่าพีเอชลดลงอย่างรวดเร็วในวันที่ 1 และค่อนข้างคงที่จนถึงวันที่ 6 ซึ่งมีค่าพีเอชเท่ากับ 4.7 (รูปที่ 4.3 (B),) ซึ่งเป็นค่าพีเอชที่ต่ำสุดเมื่อเทียบกับอาหารสูตรอื่นๆ

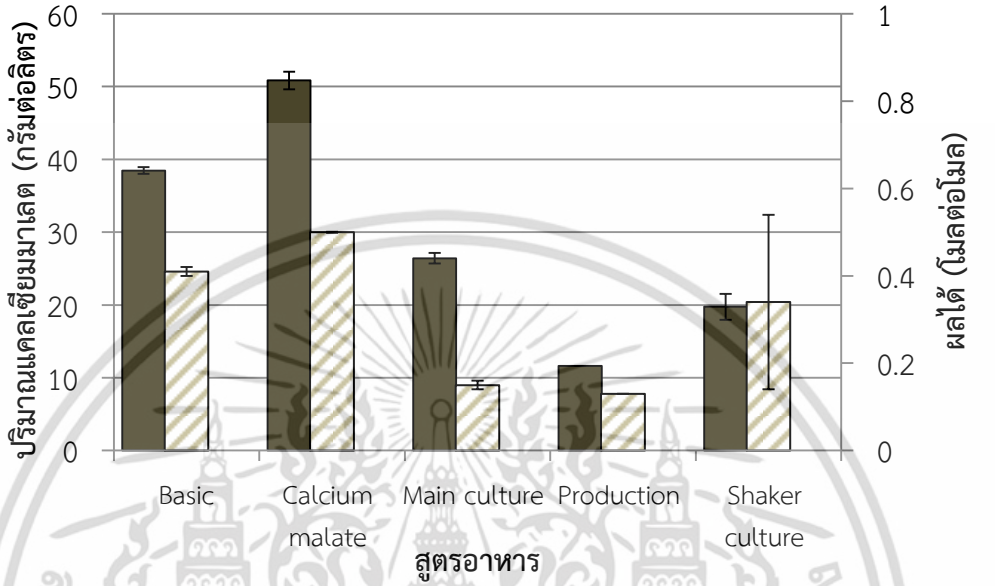
เมื่อเพาะเลี้ยงไอโซเลต FX1 ในอาหาร Calclium malate production พบว่ามีปริมาณน้ำตาลที่เหลือลดลงอย่างต่อเนื่องตั้งแต่วันที่ 1 ถึงวันที่ 3 และค่อนข้างคงที่จนถึงวันที่ 6 เหลือน้ำตาลไซโลสอยู่ 12.02±0.22 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 4.3 (A),) ซึ่งเหลือปริมาณน้ำตาลไซโลสต่ำสุดเมื่อเปรียบเทียบกับอาหารชนิดอื่น และสอดคล้องกับงานวิจัยของ Ma และคณะ (2013) ที่กล่าวว่าปริมาณน้ำตาลที่ลดลงอาจเกิดจาก แบคทีเรียนำน้ำตาลไปใช้ในการเจริญ สร้างกรดอินทรีย์ และสารเมตาบอไลต์ต่างๆ ขณะที่ค่าพีเอชลดลงอย่างรวดเร็วในวันที่ 1 และค่อยๆลดลงในวันที่ 2 ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณน้ำตาลที่ลดลง อาจเกิดจากแบคทีเรียนำน้ำตาลไปใช้ในการเจริญ สร้างกรดอินทรีย์ หลังจากนั้นค่าพีเอชค่อยๆเพิ่มขึ้นเล็กน้อยและค่อนข้างคงที่ในช่วงวันที่ 5 ถึงวันที่ 6 ซึ่งมีค่าพีเอชเท่ากับ 6.2 (รูปที่ 4.3 (B),) แสดงถึงการเพิ่มขึ้นของแคลเซียมมาเลต เนื่องจากแคลเซียมมาเลตมีค่าพีเอชประมาณ 5.5-6.5 (Schell, 1997)

เมื่อเพาะเลี้ยงไอโซเลต FX1 ในอาหาร Main culture พบว่ามีปริมาณน้ำตาลไซโลสคงที่ในวันที่ 1 ซึ่งตรงกับงานวิจัยของ Moebus (1972) รายงานว่าการคงที่ของปริมาณน้ำตาลในช่วงแรกเกิดขึ้นจากการปรับตัวของแบคทีเรียให้เข้ากับสภาวะแวดล้อม หลังจากนั้นปริมาณน้ำตาลที่เหลือลดลงอย่างต่อเนื่องจนถึงวันที่ 6 เหลือปริมาณน้ำตาลไซโลสอยู่ 10.90±0.15 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 4.3 (A),) ขณะที่ค่าพีเอชลดลงเล็กน้อยและค่อนข้างคงที่จนถึงวันที่ 6 ซึ่งมีค่าพีเอชเท่ากับ 5.3 (รูปที่ 4.3 (B),)

เมื่อเพาะเลี้ยงไอโซเลต FX1 ในอาหาร Production medium พบว่ามีปริมาณน้ำตาลไซโลสลดลงอย่างรวดเร็วในวันที่ 1 และค่อยๆลดลงจนถึงวันที่ 6 เหลือน้ำตาลไซโลสอยู่ 31.33±0.61 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 4.3 (A),) ขณะที่ค่าพีเอชลดลงอย่างรวดเร็วในวันที่ 1 และค่อนข้างคงที่จนถึงวันที่ 6 ซึ่งมีค่าพีเอชเท่ากับ 5.7 (รูปที่ 4.3 (B),)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อเพาะเลี้ยงไอโซเลต FX1 ในอาหาร Shaker culture พบว่ามีปริมาณน้ำตาลไซโลสลดลงเล็กน้อยในวันที่ 1 และลดลงเรื่อยๆถึงวันที่ 5 และค่อนข้างคงที่ถึงวันที่ 6 เหลือปริมาณน้ำตาลไซโลสอยู่ 77.33±2.31 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 4.3 (A), ⊸) ขณะที่ค่าพีเอชค่อนข้างคงที่ถึงวันที่ 3 และลดลงเล็กน้อยในวันที่ 4 และวันที่ 5 และคงที่จนถึงวันที่ 6 ซึ่งมีค่าพีเอชเท่ากับ 5.6 (รูปที่ 4.3 (B), ⊸)



รูปที่ 4.4 แสดงปริมาณแคลเซียมมาเลตที่ผลิตได้ และผลได้ของไอโซเลต FX1 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรต่างๆ เป็นระยะเวลา 6 วัน โดย ■ คือปริมาณแคลเซียมมาเลตที่ผลิตได้ และ ▨ คือผลได้

จากรูปที่ 4.4 แสดงปริมาณแคลเซียมมาเลตที่ผลิตได้ และผลได้ของไอโซเลต FX1 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร Basic medium, Calcium malate, Production medium, Main culture และ Shaker culture พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยง ไอโซเลต FX1 ในอาหาร Calcium malate production ไอโซเลต FX1 สามารถผลิตแคลเซียมมาเลตได้สูงสุด 50.84±0.71 กรัมต่อลิตร และได้ผลได้ (Yield) สูงสุดเท่ากับ 0.50±0.01 โมลต่อโมล ดังนั้นอาหาร Calcium malate production จึงมีความเหมาะสมต่อการผลิตกรดมาลิคของไอโซเลต FX1 ซึ่งแหล่งไนโตรเจนที่พบในอาหาร Calcium malate production ได้แก่ Corn steep liquor ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้จากโรงงานแป้งข้าวโพด ประกอบด้วยโปรตีนในปริมาณที่สูงถึงร้อยละ 40 โดยมวลต่อมวล และสารสกัดไนโตรเจนอิสระร้อยละ 16 โดยมวล อีกทั้งยังมีกรดอะมิโน และวิตามินเป็นส่วนประกอบอีกด้วย ซึ่งล้วนแล้วแต่เป็นสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญและผลิตกรดอินทรีย์ของเซลล์ (Sharmar และคณะ 2013) และเมื่อพิจารณาความเข้มข้นของแคลเซียมมาเลตแล้วพบว่าสามารถผลิตได้ในปริมาณมากกว่ารายงานการวิจัยของ Pitkanen และคณะ (2003) ที่เพาะเลี้ยง *Saccharomyces cerevisiae* ซึ่งสามารถผลิตกรดมาลิคได้เพียง 25 กรัมต่อลิตร โดยใช้น้ำตาลไซโลสปริมาณ 100 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งจากรายงานการผลิตกรดมาลิคโดยใช้น้ำตาลไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอนดังกล่าว จะพบว่าได้ผลผลิตค่อนข้างต่ำ เนื่องจากต้องผ่านกระบวนการเปลี่ยนไซโลสเป็นไซลูโลสก่อนจากนั้นจะถูกเปลี่ยนเป็นกลีเซอรอลดีไฮด์-3-ฟอสเฟต (Glyceroldehyde-3-phosphate) และ ฟรุคโตส-6-ฟอสเฟต (Fructose-6-phosphate) ในวัฏจักรเพนโทสฟอสเฟต (Pentose phosphate pathway) เพื่อสังเคราะห์กรดมาลิคต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 การศึกษาผลของอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดมาลิค

4.2.1 การศึกษาผลของอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดมาลิคของไอโซเลต DG2

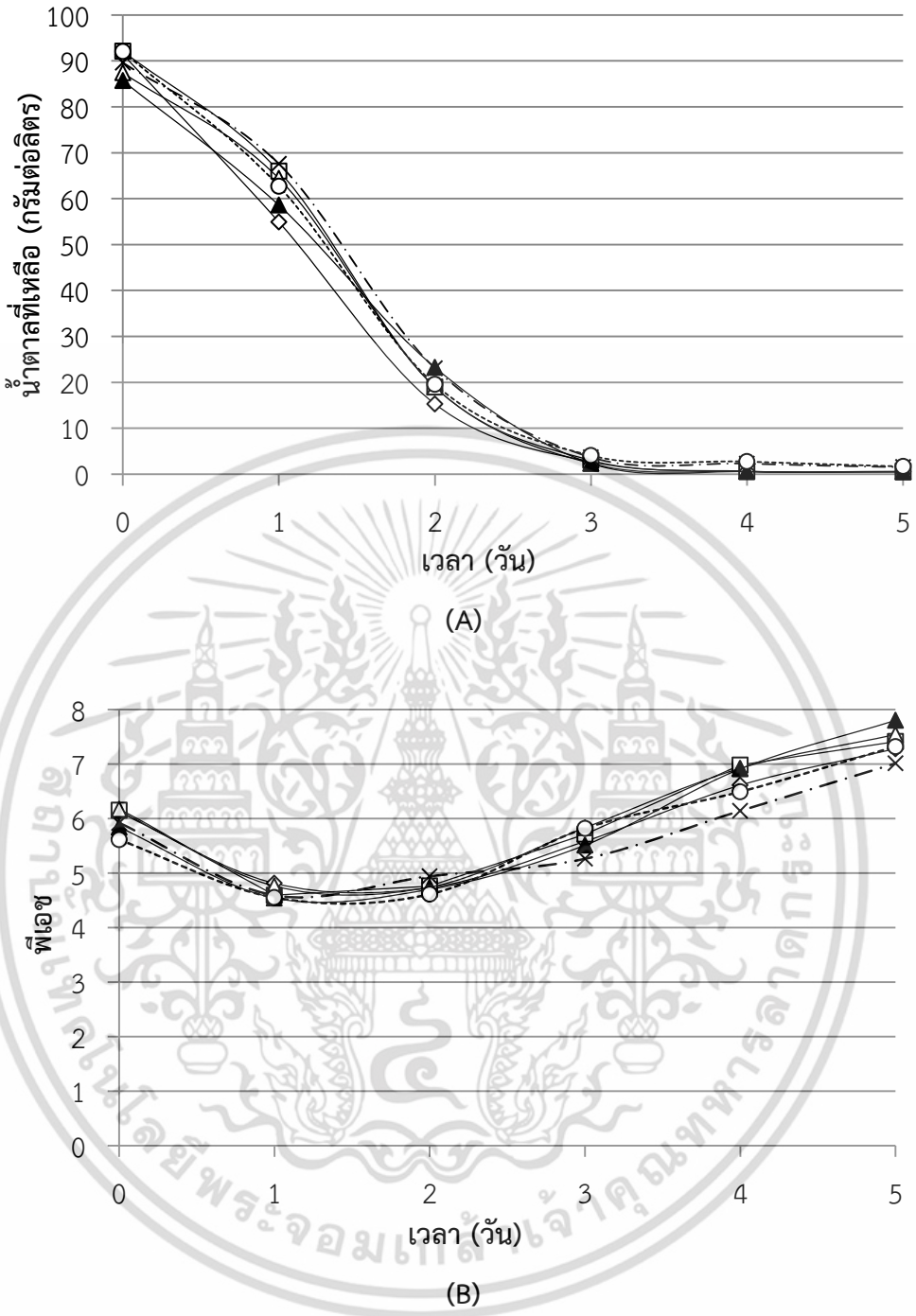
จากรายงานการศึกษาอัตราส่วนระหว่างแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนของ (Knuf และคณะ (2014) พบว่าการจำกัดปริมาณของไนโตรเจนจะช่วยให้มีการสังเคราะห์เอนไซม์มาเลตดีไฮโดร-จิเนส (Malate dehydrogenase) ที่บริเวณไซโตซอล (Cytosol) มากขึ้น ส่งผลให้เกิดกระบวนการผลิตกรดมาลิค ในบริเวณดังกล่าวมากขึ้นด้วย ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงทำการศึกษาผลของอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดมาลิค โดยใช้สูตรอาหาร Basic medium ที่ได้จากผลการทดลองข้อ 4.1.1 ปริมาตร 30 มิลลิลิตร และใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ความเข้มข้นเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร ซึ่งสูตรอาหาร Basic medium มีอัตราส่วนระหว่างแหล่งคาร์บอนต่อไนโตรเจน เท่ากับ 100 : 1 ดังนั้นจึงปรับปริมาณแหล่งไนโตรเจน $(NH_4)_2SO_4$ ให้มีอัตราส่วนต่างๆ คือ 50:1, 75:1, 125:1, 150:1 และ 200:1 โดยใช้ปริมาณ $(NH_4)_2SO_4$ เท่ากับ 4, 2.6, 1.6, 1.3 และ 1 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และใช้หัวเชื้อร้อยละ 5 โดยปริมาตร ซึ่งมีค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.748 นำไปเพาะเลี้ยงที่สภาวะเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นเก็บตัวอย่างทุกๆวันเป็นระยะเวลา 5 วัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 9,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกตะกอนเซลล์ และแคลเซียมคาร์บอเนตออก นำส่วนใสที่ได้มาวิเคราะห์หาปริมาณแคลเซียมมาเลตด้วยวิธีการไทเทรต ตรวจสอบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS และตรวจสอบพีเอชด้วยเครื่องวัดพีเอช (pH meter) ผลการทดลองที่ได้แสดงดังตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 แสดงปริมาณแคลเซียมมาเลต ผลได้ และค่าพีเอชจากการเพาะเลี้ยงไอโซเลต DG2 ในอาหาร Basic medium ที่มีอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนแตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 5 วัน

Isolate	C/N ratio	Quantity of Calcium malate (g/l)	Yield (mol/mol)	Final pH
DG2	50:1	46.17±0.34	0.53±0.00	7.3
	75:1	35.34±0.88	0.40±0.01	7.4
	100:1	44.63±0.34	0.54±0.00	7.5
	125:1	44.44±0.21	0.53±0.00	7.0
	150:1	41.58±0.31	0.51±0.00	7.8
	200:1	44.23±0.31	0.51±0.00	7.3

จากตารางที่ 4.3 แสดงปริมาณแคลเซียมมาเลต และผลได้เมื่อเพาะเลี้ยงไอโซเลต DG2 ในอาหาร Basic medium โดยใช้อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่แตกต่างกัน ได้แก่ 50:1 75:1 100:1 125:1 150:1 และ 200:1 และได้มีการเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลที่เหลือ และพีเอชของไอโซเลต DG2 ที่ทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 5 วัน ดังรูปที่ 4.5 และเปรียบเทียบปริมาณแคลเซียมมาเลตที่ผลิตได้และผลได้ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่างๆ ดังรูปที่ 4.6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.5 แสดงปริมาณน้ำตาลที่เหลือ และค่าพีเอชของไอโซเลต DG2 ณ เวลาต่างๆ โดยเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร Basic medium ที่มีอัตราส่วนระหว่างแหล่งคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่างๆ คือ 50:1, 75:1, 100:1, 125:1, 150:1 และ 200:1 ตามลำดับ

โดย —◇— คือ อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 50:1
—□— คือ อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 75:1
—△— คือ อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 100:1
- -×- - คือ อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 125:1
—▲— คือ อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 150:1
···○··· คือ อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 200:1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากรูปที่ 4.5 (A) แสดงปริมาณน้ำตาลที่เหลือ และรูปที่ 4.5 (B) แสดงพีเอชของไอโซเลต DG2 ณ เวลาต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร Basic medium และปรับอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่แตกต่างกัน และใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนความเข้มข้นเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร พบว่าที่อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 50:1 มีปริมาณน้ำตาลลดลงอย่างต่อเนื่องในวันที่ 1 และ 2 และค่อยๆลดลงจนถึงวันที่ 5 เหลือน้ำตาลกลูโคสอยู่เพียง 0.53±0.05 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 4.5 (A), —◇—) ขณะที่ค่าพีเอชลดลงอย่างรวดเร็วในวันที่ 1 และค่อนข้างคงที่ถึงวันที่ 2 และค่อยๆเพิ่มขึ้นเรื่อยๆจนถึงกระทั่งวันที่ 5 ซึ่งค่าพีเอชเท่ากับ 7.3 (รูปที่ 4.5 (B), —◇—) แสดงถึงการเพิ่มขึ้นของแคลเซียมมาเลต เนื่องจากแคลเซียมมาเลตมีค่าพีเอชประมาณ 5.5-6.5 (Schell, 1997)

เมื่อทำการเพาะเลี้ยงไอโซเลต DG2 ในอาหาร Basic medium ที่มีอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่ เท่ากับ 75:1 พบว่ามีปริมาณน้ำตาลลดลงอย่างรวดเร็วในวันที่ 1 และวันที่ 2 และลดลงเรื่อยๆถึงวันที่ 5 เหลือน้ำตาลกลูโคสอยู่เพียง 0.61±0.01 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 4.5 (A),—□—) ขณะที่ค่าพีเอชลดลงต่ำสุดในวันที่ 1 และคงที่ถึงวันที่ 2 และเพิ่มขึ้นเรื่อยๆถึงวันที่ 5 ซึ่งมีค่าพีเอชเท่ากับ 7.4 (รูปที่ 4.5 (B), —□—)

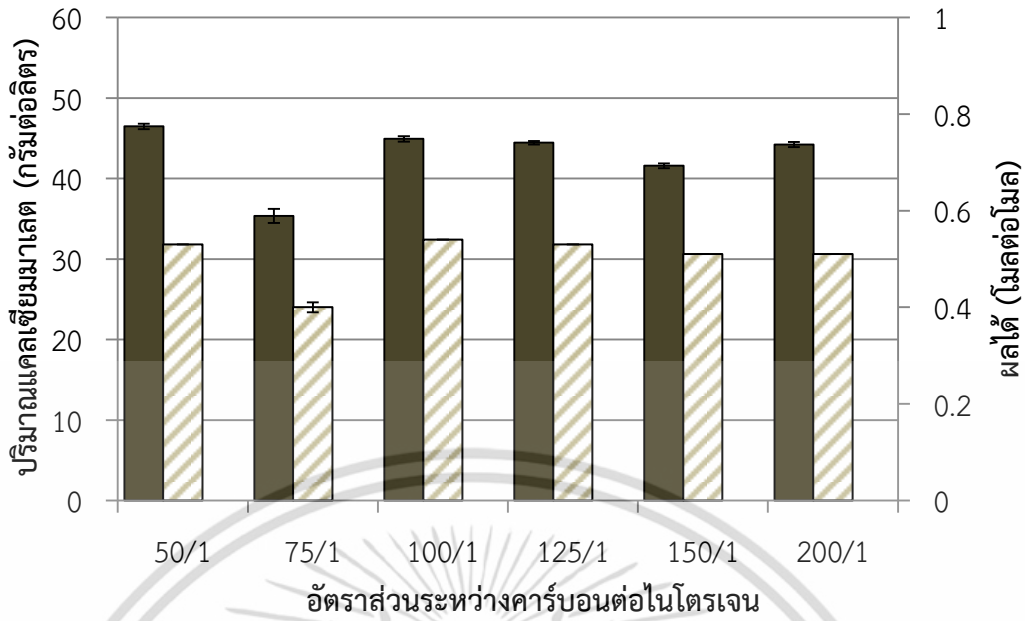
เมื่อทำการเพาะเลี้ยงไอโซเลต DG2 ในอาหาร Basic medium ที่มีอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่ เท่ากับ 100:1 พบว่ามีปริมาณน้ำตาลลดลงอย่างรวดเร็วในวันที่ 1 และวันที่ 2 และลดลงเรื่อยๆถึงวันที่ 5 เหลือน้ำตาลกลูโคสอยู่เพียง 0.48±0.02 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 4.5 (A), —△—) ซึ่งน้อยที่สุดเมื่อเทียบกับอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนอื่นๆ ขณะที่ค่าพีเอชลดลงต่ำสุดในวันที่ 1 และค่อนข้างคงที่ถึงวันที่ 2 ซึ่งสอดคล้องกับการใช้ปริมาณน้ำตาลในวันที่ 1 และ 2 เพื่อใช้ในการเจริญและผลิตกรดอินทรีย์ของเซลล์ จากนั้นค่าพีเอชเพิ่มขึ้นเรื่อยๆถึงวันที่ 5 ซึ่งมีค่าพีเอชเท่ากับ 7.5 (รูปที่ 4.5 (B), —△—)

เมื่อทำการเพาะเลี้ยงไอโซเลต DG2 ในอาหาร Basic medium ที่มีอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่ เท่ากับ 125:1 พบว่ามีปริมาณน้ำตาลลดลงอย่างรวดเร็วในวันที่ 1 และวันที่ 2 และลดลงเรื่อยๆถึงวันที่ 5 เหลือน้ำตาลกลูโคสอยู่เพียง 0.61±0.01 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 4.5 (A), -×-) ขณะที่ค่าพีเอชลดลงต่ำสุดในวันที่ 1 และเพิ่มขึ้นเรื่อยๆถึงวันที่ 5 ซึ่งมีค่าพีเอชเท่ากับ 7.0 (รูปที่ 4.5 (B), -×-) และเป็นค่าพีเอชที่ต่ำสุดเมื่อเปรียบเทียบกับอาหาร Basic medium ที่มีอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนอื่นๆ

เมื่อทำการเพาะเลี้ยงไอโซเลต DG2 ในอาหาร Basic medium ที่มีอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่ เท่ากับ 150:1 พบว่ามีปริมาณน้ำตาลลดลงอย่างรวดเร็วในวันที่ 1 และวันที่ 2 และลดลงเรื่อยๆถึงวันที่ 5 เหลือน้ำตาลกลูโคสอยู่เพียง 0.52±0.02 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 4.5 (A), —▲—) ขณะที่ค่าพีเอชลดลงต่ำสุดในวันที่ 1 และเพิ่มขึ้นเรื่อยๆถึงวันที่ 5 ซึ่งมีค่าพีเอชเท่ากับ 7.8 (รูปที่ 4.5 (B), —▲—)

เมื่อทำการเพาะเลี้ยงไอโซเลต DG2 ในอาหาร Basic medium ที่มีอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่ เท่ากับ 200:1 พบว่ามีปริมาณน้ำตาลที่ลดลงอย่างรวดเร็วในวันที่ 1 และวันที่ 2 และลดลงเรื่อยๆถึงวันที่ 5 เหลือน้ำตาลกลูโคสอยู่ 0.67±0.02 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 4.5 (A), ---○---) ซึ่งเหลือปริมาณมากสุดเมื่อเทียบกับอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนอื่นๆ ขณะที่ค่าพีเอชลดลงต่ำสุดในวันที่ 1 และเพิ่มขึ้นเรื่อยๆถึงวันที่ 5 ซึ่งมีค่าพีเอชเท่ากับ 7.3 (รูปที่ 4.5 (B), ---○---)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.6 แสดงปริมาณแคลเซียมมาเลตที่ผลิตได้ และผลได้ของไอโซเลต DG2 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร Basic medium ที่มีอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนแตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 5 วัน โดย ■ คือปริมาณแคลเซียมมาเลตที่ผลิตได้ และ ▨ คือผลได้

จากรูปที่ 4.6 แสดงปริมาณแคลเซียมมาเลตที่ผลิตได้ และผลได้ของไอโซเลต DG2 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร Basic medium ที่มีอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน เท่ากับ 50:1 75:1 100:1 125:1 150:1 และ 200:1 พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงไอโซเลต DG2 ในอาหาร Basic medium ที่มีอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน เท่ากับ 50:1 ไอโซเลต DG2 สามารถผลิตแคลเซียมมาเลตได้สูงสุด 46.17±0.34 กรัมต่อลิตร และมีค่าผลได้เท่ากับ 0.53±0.00 โมลต่อโมล แต่เมื่อเพาะเลี้ยงไอโซเลต DG2 ในอาหาร Basic medium ที่มีอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน เท่ากับ 100:1 ซึ่งเป็นอัตราส่วนเดิมที่มีอยู่ในอาหารสูตร Basic medium ได้ค่าผลได้ (Yield) สูงสุด 0.54±0.00 โมลต่อโมล ดังนั้นจากการทดลองนี้อาจจะกล่าวได้ว่า อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่แตกต่างกันไม่มีผลต่อการผลิตกรดมาลิคโดยไอโซเลต DG2 อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการวิจัยของ Ochsenreither และคณะ (2014) ที่ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Aspergillus oryzae* โดยใช้ไซโลส กลูโคส และกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่แตกต่างกันไม่ส่งผลต่อการผลิตกรดมาลิคแต่ส่งผลให้มีการผลิตกรดฟูมาริคเพิ่มสูงขึ้นเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนสูงสุดที่อัตราส่วน 300:1 ให้ปริมาณกรดที่ผลิตได้เท่ากับ 0.049 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และเมื่อทำการเพิ่มปริมาณแหล่งไนโตรเจนให้สูงขึ้นจะส่งผลให้การผลิตกรดฟูมาริคลดลง แต่ไม่มีผลต่อการผลิตกรดมาลิค นอกจากนี้มีรายงานการวิจัยของ Jackson และ Bothast (1990) โดยศึกษาการเจริญ การสร้างสปอร์ และผลต่อการผลิตกรดอินทรีย์ โดยทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Colletotrichum truncatum* NRRL 13737 ในอาหารที่มีอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่แตกต่าง พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่ใช้อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 15:1 ซึ่งใช้ปริมาณแหล่งไนโตรเจนในปริมาณมาก มีปริมาณสปอร์และมวลเซลล์สูงสุด 150×10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร และ 11.9×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และมีการใช้ปริมาณแหล่งคาร์บอนสูงสุดอีกด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.2 การศึกษาผลของอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดมาลิคของไอโซเลต FX1

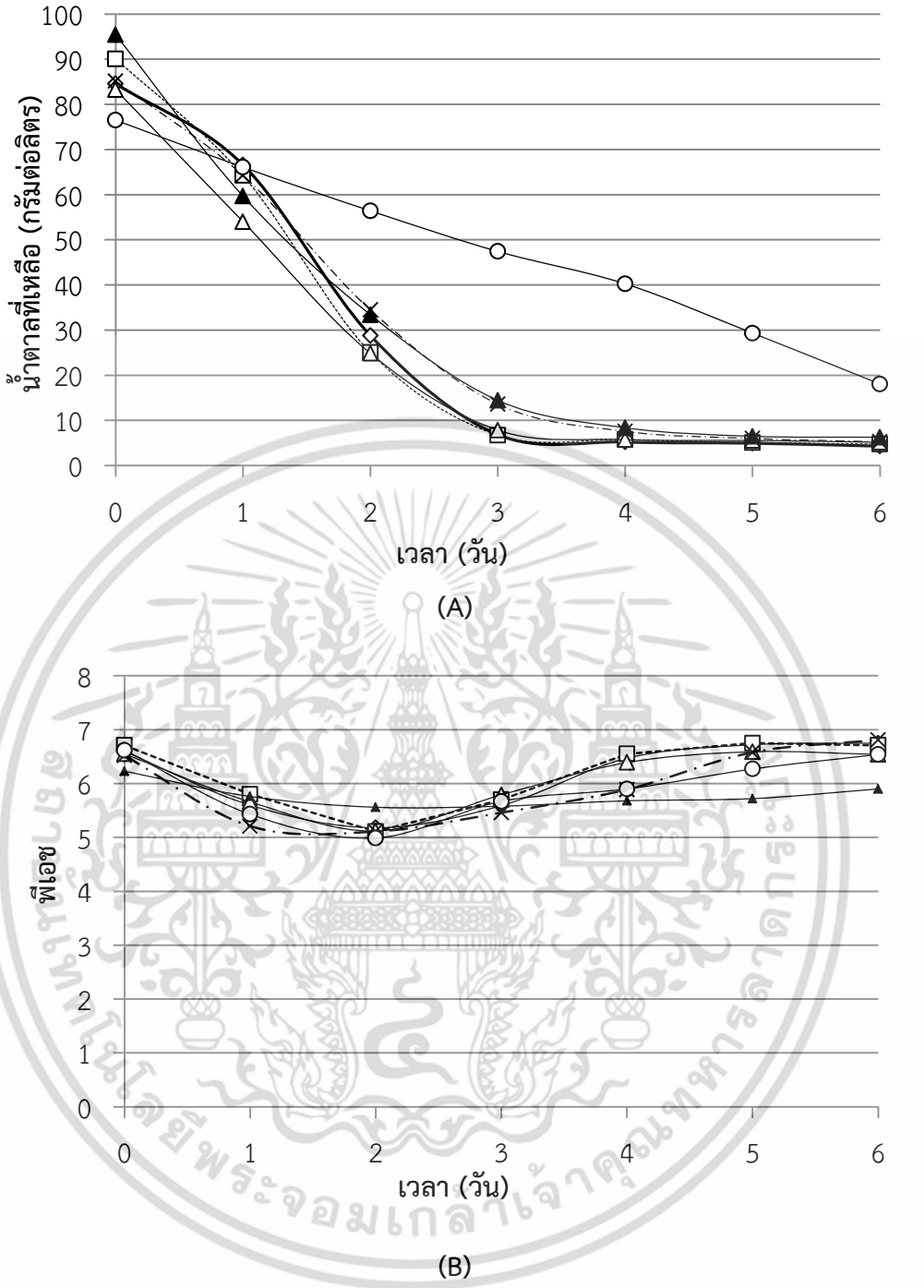
ทำการศึกษาผลของอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดมาลิคของไอโซเลต FX1 โดยใช้สูตรอาหาร Calcium malate production ที่ได้จากผลการทดลองข้อ 4.1.2 ปริมาตร 30 มิลลิลิตร และใช้น้ำตาลไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอนความเข้มข้นเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร โดยอาหาร Calcium malate production มีอัตราส่วนระหว่างแหล่งคาร์บอนต่อไนโตรเจน เท่ากับ 30:1 ดังนั้นจึงทำการปรับปริมาตรแหล่งไนโตรเจนที่ใช้ ได้แก่ Corn steep liquor ในอัตราส่วนต่างๆ คือ 10:1, 20:1, 40:1, 50:1 และ 100:1 โดยใช้ Corn steep liquor ปริมาตร 13, 6.67, 3.34, 2.67 และ 1.34 มิลลิลิตรต่อลิตร ตามลำดับ และใช้หัวเชื้อร้อยละ 5 โดยปริมาตร ซึ่งมีค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรเท่ากับ 0.894 นำไปเพาะเลี้ยงที่สภาวะเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นเก็บตัวอย่างทุกๆวันเป็นระยะเวลา 6 วัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 9,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกตะกอนเซลล์ และแคลเซียมคาร์บอเนตออก ส่วนใสที่ได้มาวิเคราะห์หาปริมาณแคลเซียมมาเลตด้วยวิธีการไทเทรต ตรวจสอบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS และตรวจสอบพีเอชด้วยเครื่องวัดพีเอช (pH meter) ผลการทดลองที่ได้แสดงดังตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 แสดงปริมาณแคลเซียมมาเลต ผลได้ และค่าพีเอชเมื่อเพาะเลี้ยงไอโซเลต FX1 ในอาหาร Calcium malate production ที่มีอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนแตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 6 วัน

Isolate	C/N ratio	Quantity of Calcium malate (g/l)	Yield (mol/mol)	Final pH
FX1	10:1	46.67±1.35	0.51±0.01	6.8
	20:1	45.29±1.00	0.16±0.01	6.7
	30:1	45.71±0.00	0.51±0.00	5.1
	40:1	45.72±0.34	0.50±0.00	6.8
	50:1	42.54±1.72	0.42±0.02	5.9
	100:1	44.78±1.62	0.67±0.02	6.5

จากตารางที่ 4.4 แสดงปริมาณแคลเซียมมาเลต และผลได้เมื่อเพาะเลี้ยงไอโซเลต FX1 ในอาหาร Calcium malate production ที่มีอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่แตกต่างกัน ได้แก่ 10:1 20:1 30:1 40:1 50:1 และ 100:1 นอกจากนี้ได้มีการเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลที่เหลือและค่าพีเอชของไอโซเลต FX1 ที่ทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 6 วัน ดังรูปที่ 4.7 และเปรียบเทียบปริมาณแคลเซียมมาเลตที่ผลิตได้ และผลได้ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่างๆ ดังรูปที่ 4.8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.7 แสดงปริมาณน้ำตาลที่เหลือ และค่าพีเอชของไอโซเลต FX1 ณ เวลาต่างๆ โดยเพาะเลี้ยงในอาหาร Calcium malate production ที่มีอัตราส่วนระหว่างแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนต่างๆ คือ 10:1, 20:1, 30:1, 40:1, 50:1 และ 100:1 ตามลำดับ

โดย —◇— คือ อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 10:1
---□--- คือ อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 20:1
—△— คือ อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 30:1
-·×·- คือ อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 40:1
—▲— คือ อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 50:1
---□--- คือ อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 100:1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากรูปที่ 4.7 (A) แสดงปริมาณน้ำตาลที่เหลือ และรูปที่ 4.7(B) แสดงพีเอชของไอโซเลต FX1 ณ เวลาต่างๆ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร Calcium malate production ที่มีอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่แตกต่างกัน และใช้ไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอนความเข้มข้นเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร พบว่าอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน เท่ากับ 10:1 มีปริมาณน้ำตาลลดลงอย่างรวดเร็วในวันที่ 1 และ 2 และค่อยๆลดลงถึงวันที่ 3 และค่อนข้างคงที่ถึงวันที่ 6 เหลือน้ำตาลไซโลสอยู่ 4.28±0.20 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 4.7 (A), —◇—) ซึ่งน้อยที่สุดเมื่อเทียบกับอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนอื่นๆ ขณะที่ค่าพีเอชลดลงอย่างรวดเร็วในวันที่ 2 และค่อยๆเพิ่มขึ้นเรื่อยถึงวันที่ 5 และค่อนข้างคงที่ถึงวันที่ 6 ซึ่งค่าพีเอชเท่ากับ 6.8 (รูปที่ 4.7 (B), —◇—)

เมื่อทำการเพาะเลี้ยงไอโซเลต FX1 ในอาหาร Calcium malate production ที่มีอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน เท่ากับ 20:1 พบว่ามีปริมาณน้ำตาลลดลงอย่างรวดเร็วในวันที่ 1 และวันที่ 2 และลดลงเรื่อยๆถึงวันที่ 3 และค่อนข้างคงที่ถึงวันที่ 6 เหลือน้ำตาลไซโลสอยู่ 4.73±0.03 (รูปที่ 4.7 (A), ---□---) กรัมต่อลิตร ขณะที่ค่าพีเอชลดลงต่ำสุดในวันที่ 2 และเพิ่มขึ้นเรื่อยๆถึงวันที่ 5 และคงที่จนกระทั่งวันที่ 6 ซึ่งมีค่าพีเอชเท่ากับ 6.7 (รูปที่ 4.7 (B), ---□---)

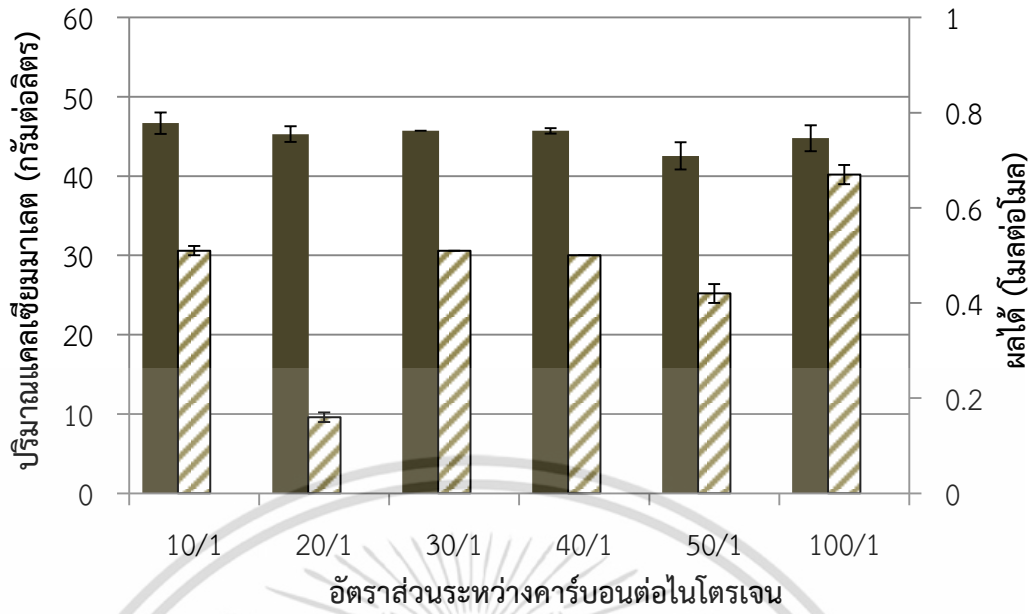
เมื่อทำการเพาะเลี้ยงไอโซเลต FX1 ในอาหาร Calcium malate production ที่มีอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน เท่ากับ 30:1 พบว่ามีปริมาณน้ำตาลลดลงอย่างรวดเร็วในวันที่ 1 และวันที่ 2 และลดลงเรื่อยๆถึงวันที่ 3 และค่อนข้างคงที่ถึงวันที่ 6 เหลือน้ำตาลไซโลสอยู่ 5.16±0.07 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 4.7 (A), —△—) ขณะที่ค่าพีเอชลดลงต่ำสุดในวันที่ 2 และเพิ่มขึ้นเรื่อยๆถึงวันที่ 5 และคงที่จนกระทั่งวันที่ 6 ซึ่งมีค่าพีเอชเท่ากับ 5.1 (รูปที่ 4.7 (B), —△—

เมื่อทำการเพาะเลี้ยงไอโซเลต FX1 ในอาหาร Calcium malate production ที่มีอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน เท่ากับ 40:1 พบว่ามีปริมาณน้ำตาลลดลงอย่างรวดเร็วในวันที่ 1 และวันที่ 2 และลดลงเรื่อยๆถึงวันที่ 6 เหลือน้ำตาลไซโลสอยู่ 5.25±0.16 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 4.7 (A), -×-) ขณะที่ค่าพีเอชลดลงต่ำสุดในวันที่ 1 และเพิ่มขึ้นเรื่อยๆถึงวันที่ 5 และคงที่จนกระทั่งวันที่ 6 ซึ่งมีค่าพีเอชเท่ากับ 6.8 (รูปที่ 4.7 (B), -×-)

เมื่อทำการเพาะเลี้ยงไอโซเลต FX1 ในอาหาร Calcium malate production ที่มีอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน เท่ากับ 50:1 พบว่ามีปริมาณน้ำตาลลดลงอย่างรวดเร็วในวันที่ 1 และวันที่ 2 และลดลงเรื่อยๆถึงวันที่ 6 เหลือน้ำตาลไซโลสออยู่เพียง 6.28±0.19 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 4.7 (A), —▲—) ขณะที่ค่าพีเอชลดลงลดลงเรื่อยๆถึงวันที่ 2 และค่อนข้างคงที่ถึงวันที่ 6 ซึ่งมีค่าพีเอชเท่ากับ 5.9 (รูปที่ 4.7 (B), —▲—)

เมื่อทำการเพาะเลี้ยงไอโซเลต FX1 ในอาหาร Calcium malate production ที่มีอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน เท่ากับ 100:1 พบว่าปริมาณน้ำตาลค่อยๆลดลงอย่างต่อเนื่องตั้งแต่วันที่ 1 ถึงวันที่ 6 เหลือน้ำตาลไซโลสอยู่ 18.06±0.25 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 4.7 (A),—○—) ซึ่งเหลือปริมาณมากสุดเมื่อเทียบกับอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนอื่นๆ ขณะที่ค่าพีเอชลดลงต่ำสุดในวันที่ 2 และเพิ่มขึ้นเรื่อยๆถึงวันที่ 6 ซึ่งมีค่าพีเอชเท่ากับ 6.5 (รูปที่ 4.7 (B), —○—) แสดงถึงการเพิ่มขึ้นของแคลเซียมมาเลต เนื่องจากแคลเซียมมาเลตมีค่าพีเอชประมาณ 5.5-6.5 (Schell, 1997)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.8 แสดงปริมาณของแคลเซียมมาเลตที่ผลิตได้ และผลได้ของไอโซเลต FX1 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร Calcium malate production ที่มีอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนแตกต่างกันเป็นระยะเวลา 6 วัน โดย ■ คือปริมาณแคลเซียมมาเลตที่ผลิตได้ และ ▨ คือผลได้

จากรูปที่ 4.8 แสดงปริมาณแคลเซียมมาเลตที่ผลิตได้ และผลได้ของไอโซเลต FX1 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร Calcium malate production ที่มีอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 10:1 20:1 30:1 40:1 50:1 และ 100:1 พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงไอโซเลต FX1 ในอาหาร Calcium malate production ที่มีอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน เท่ากับ 10:1 ไอโซเลต FX1 สามารถผลิตแคลเซียมมาเลตได้สูงสุด 46.67±1.35 กรัมต่อลิตร และมีค่าผลได้เท่ากับ 0.51±0.01 โมลต่อโมล แต่เมื่อเพาะเลี้ยงไอโซเลต FX1 ในอาหาร Calcium malate production ที่มีอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน เท่ากับ 100:1 กลับได้ค่าผลได้ (Yield) สูงสุดเท่ากับ 0.67±0.02 ดังนั้นอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 100:1 จึงมีความเหมาะสมต่อการผลิตแคลเซียมมาเลตของไอโซเลต FX1 ซึ่งใช้ Corn steep liquor เป็นแหล่งไนโตรเจนในปริมาณน้อยกว่าที่พบในสูตรอาหาร Calcium malate production ที่รายงานโดย Khan และคณะ (2014) ถึงแม้ว่าอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน เท่ากับ 10:1 สามารถผลิตแคลเซียมมาเลตได้สูงกว่าอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน เท่ากับ 100:1 เล็กน้อย แต่มีการใช้ปริมาณไซโลสสูงกว่าส่งผลให้ผลได้ของแคลเซียมมาเลตที่ผลิตได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน เท่ากับ 100:1 มีค่าสูงสุด นอกจากนี้ยังมีรายงานการวิจัยของ Ochsenreither และคณะ (2014) กล่าวว่าการใช้ไนโตรเจนเริ่มต้นในปริมาณมากจะส่งผลให้มวลเซลล์มีปริมาณมากขึ้น ซึ่งการเพิ่มขึ้นของมวลเซลล์นี้เป็นส่วนสำคัญที่ทำให้เกิดการใช้แหล่งคาร์บอนปริมาณมากขึ้นในการเจริญ ซึ่งส่งผลให้ค่าผลได้ของการผลิตลดลงด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 การศึกษาผลของชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดมาลิค

4.3.1 การศึกษาผลของชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดมาลิคของไอโซเลต DG2

จากการศึกษาของ Liu และ Steinbuchel (1997) ใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Aureobasidium pullulans* เพื่อผลิตกรดมาลิค พบว่าสามารถผลิตกรดมาลิคได้ปริมาณ 4.5 กรัมต่อลิตร และจากรายงานการวิจัยของ Zou และคณะ (2016) สามารถผลิตกรดมาลิคได้สูงถึง 80.4 กรัมต่อลิตรเมื่อทำการเพาะเลี้ยง *A. pullulans* สายพันธุ์ YJ 6-11 โดยใช้ไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอน อีกทั้งกากน้ำตาลซึ่งเป็นของเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมที่มีราคาต้นทุนต่ำเริ่มเป็นที่น่าสนใจต่อการนำมาผลิตกรดอินทรีย์ (Kim และคณะ, 2015) ดังนั้นในการศึกษานี้จึงทำการศึกษาผลของชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดมาลิคโดยใช้สูตรของอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดมาลิคจากผลการทดลองหัวข้อ 4.1.1 คือ อาหารสูตร Basic medium ปริมาตร 30 มิลลิลิตร โดยใช้หัวเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 5 โดยปริมาตร ซึ่งมีค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.748 และใช้แหล่งคาร์บอนที่ต่างกัน คือ กลูโคส ไซโลส กลีเซอรอล ซูโครส กากน้ำตาล (Molasses) และกากน้ำตาลที่กำจัดพิษ (Detox-molasses) โดยใช้ปริมาณแหล่งคาร์บอน 100, 100, 102, 98, 200 และ 200 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ นำไปเพาะเลี้ยงที่สภาวะเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นเก็บตัวอย่างวันที่ 0 และวันที่ 5 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 9,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกตะกอนเซลล์ และแคลเซียมคาร์บอเนตออก นำส่วนใสที่ได้มาวิเคราะห์หาปริมาณแคลเซียมมาเลตด้วยวิธีการไทเทรต ตรวจสอบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS และตรวจสอบปริมาณน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธี Phenol-Sulphuric acid และตรวจสอบพีเอชด้วยเครื่องวัดพีเอช (pH meter) ผลการทดลองที่ได้แสดงดังตารางที่ 4.5

จากตารางที่ 4.5 แสดงปริมาณแคลเซียมมาเลต ผลได้ ปริมาณแหล่งคาร์บอนเริ่มต้น ปริมาณแหล่งคาร์บอนที่เหลือ และพีเอช เมื่อเพาะเลี้ยงไอโซเลต DG2 ในอาหาร Basic medium ที่มีแหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน ได้แก่ กลูโคส ไซโลส กลีเซอรอล ซูโครส กากน้ำตาล (Molasses) และกากน้ำตาลกำจัดพิษ (Detox-molasses) ตามลำดับ นอกจากนี้ได้มีการเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลที่เหลือ ค่าพีเอช ของไอโซเลต DG2 เมื่อทำการเพาะเลี้ยง เป็นระยะเวลา 5 วัน และเปรียบเทียบปริมาณแคลเซียมมาเลตที่ผลิตได้ และผลได้เมื่อใช้อาหาร Basic medium ที่มีแหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน ดังรูปที่ 4.9

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 แสดงปริมาณแคลเซียมมาเลต ผลได้ ปริมาณแหล่งคาร์บอนเริ่มต้น ปริมาณแหล่งคาร์บอนที่เหลือ และค่าพีเอช เมื่อเพาะเลี้ยงไอโซเลต DG2 ในอาหาร Basic medium ที่มีแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ เป็นระยะเวลา 5 วัน

Isolate	Condition				Yield (mol/mol)	pH	
	Carbon source	Initial Concentration of carbon source (g/l)	Final Concentration of carbon source (g/l)	Quantity of Calcium malate (g/l)		Initial pH	Final pH
DG2	Glucose	111.90±2.72	29.66±2.77	42.60±0.92	0.53±0.01	7.1	6.9
	Xylose	88.58±2.02	6.49±0.17	42.28±0.91	0.45±0.01	6.1	6.5
	Glycerol	-	-	1.75±0.07	-	6.9	7.6
	Sucrose	116.63±2.01	46.41±0.65	1.43±0.15	0.04±0.00	7.4	7.4
	Molasses	147.79±5.43	112.49±2.69	41.33±0.35	1.23±0.01	6.1	6.5
	Detox-Molasses	151.95±2.60	112.96±0.68	48.98±0.00	1.31±0.00	5.7	5.5

จากตารางที่ 4.5 แสดงปริมาณน้ำตาลที่เหลือ และค่าพีเอชเริ่มต้นและค่าพีเอชในวันสุดท้ายของไอโซเลต DG2 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร Basic medium โดยใช้แหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน คือ กลูโคส ไซโลส กลีเซอรอล ซูโครส กากน้ำตาล (Molasses) และกากน้ำตาลที่กำจัดพิษ (Detox-molasses) พบว่า เมื่อใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนเริ่มต้น 111.90 กรัมต่อลิตร หลังจากการเพาะเลี้ยงไอโซเลต DG2 เป็นระยะเวลา 5 วัน พบว่าปริมาณน้ำตาลกลูโคสลดลงเหลือ 29.66±2.77 กรัมต่อลิตร และเมื่อพิจารณาจากค่าพีเอชพบว่าพีเอชของน้ำเลี้ยงมีค่าลดลงจากวันที่ 1 เล็กน้อย ซึ่งมีค่าพีเอชเท่ากับ 6.9

เมื่อใช้น้ำตาลไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอน ภายหลังจากการทำการเพาะเลี้ยงไอโซเลต DG2 เป็นระยะเวลา 5 วัน พบว่าปริมาณน้ำตาลไซโลสลดลงเหลือ 6.49±0.17 กรัมต่อลิตร และเมื่อพิจารณาจากค่าพีเอชพบว่าพีเอชของน้ำเลี้ยงมีค่าเพิ่มขึ้นจากวันที่ 1 เล็กน้อย ซึ่งมีค่าพีเอชเท่ากับ 6.5

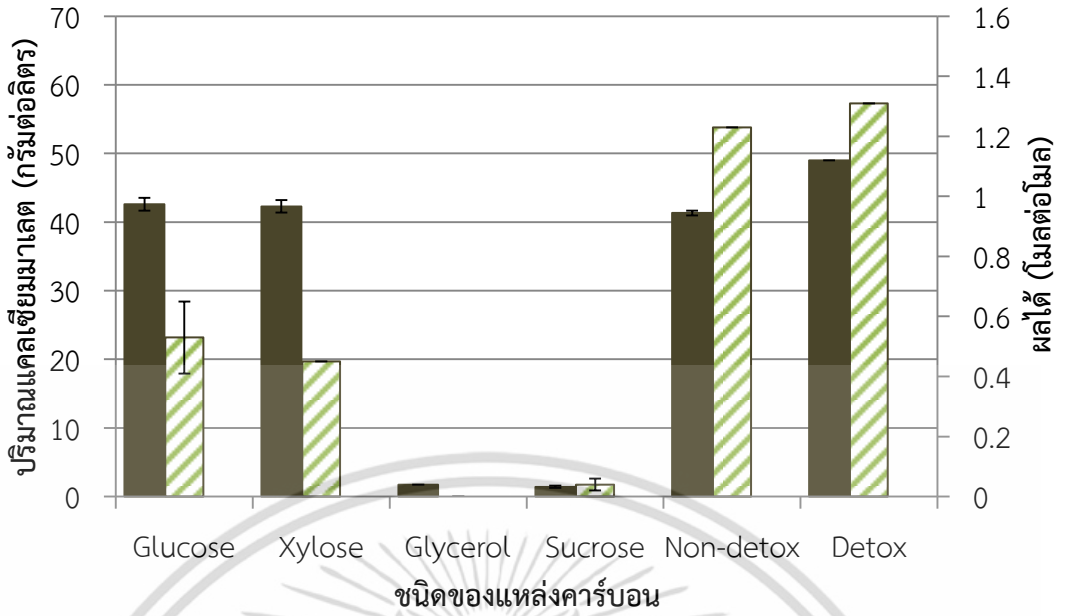
เมื่อใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน ภายหลังจากการทำการเพาะเลี้ยงไอโซเลต DG2 เป็นระยะเวลา 5 วัน พบว่า ไอโซเลต DG2 สามารถผลิตแคลเซียมมาเลตได้ปริมาณ 1.75±0.07 ซึ่งค่อนข้างน้อย อาจเนื่องจากไอโซเลต DG2 สามารถใช้กลีเซอรอลเพียงเล็กน้อยในการเจริญและผลิตแคลเซียมมาเลต และเมื่อพิจารณาจากค่าพีเอชพบว่าพีเอชของน้ำเลี้ยงมีค่าเพิ่มขึ้นจากวันที่ 1 ซึ่งมีค่าพีเอชเท่ากับ 7.6

เมื่อใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน ภายหลังการเพาะเลี้ยงไอโซเลต DG2 เป็นระยะเวลา 5 วัน พบว่าปริมาณน้ำตาลซูโครสลดลงเหลือ 46.41±0.65 กรัมต่อลิตร และเมื่อพิจารณาจากค่าพีเอชพบว่าพีเอชของน้ำเลี้ยงมีค่าคงที่จากวันที่ 1 ซึ่งมีค่าพีเอชเท่ากับ 7.4

เมื่อใช้กากน้ำตาล (Molasses) เป็นแหล่งคาร์บอน ภายหลังการเพาะเลี้ยงไอโซเลต DG2 เป็นระยะเวลา 5 วัน พบว่าปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในกากน้ำตาลลดลงเหลือ 112.49±2.69 กรัมต่อลิตร และเมื่อพิจารณาจากค่าพีเอชพบว่าพีเอชของน้ำเลี้ยงเพิ่มขึ้นจากวันที่ 1 เล็กน้อย ซึ่งมีค่าพีเอชเท่ากับ 6.5

เมื่อใช้กากน้ำตาลที่กำจัดพิษ (Detox-molasses) เป็นแหล่งคาร์บอน ภายหลังการเพาะเลี้ยงไอโซเลต DG2 เป็นระยะเวลา 5 วัน พบว่าปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในกากน้ำตาลที่กำจัดพิษลดลงเหลือ 112.96±0.68 กรัมต่อลิตร และเมื่อพิจารณาจากค่าพีเอชพบว่าพีเอชของน้ำเลี้ยงลดลงจากวันที่ 1 เล็กน้อย ซึ่งมีค่าพีเอชเท่ากับ 5.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.9 แสดงปริมาณของแคลเซียมมาเลตที่ผลิตได้ และผลได้ของไอโซเลต DG2 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร Basic medium ที่มีชนิดของแหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 5 วัน โดย ■ คือปริมาณแคลเซียมมาเลตที่ผลิตได้ และ ▨ คือผลได้

จากรูปที่ 4.9 แสดงปริมาณแคลเซียมมาเลตที่ผลิตได้ และผลได้ของไอโซเลต DG2 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร Basic medium โดยใช้แหล่งคาร์บอนต่างชนิดกัน คือ กลูโคส ไซโลส กลีเซอรอล ซูโครส กากน้ำตาล (Molasses) และกากน้ำตาลที่กำจัดพิษ (Detox-molasses) พบว่าไอโซเลต DG2 สามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้ทั้ง 6 ชนิด โดยเรียงตามปริมาณแคลเซียมมาเลตที่ผลิตได้จากมากไปน้อย ดังนี้ คือ กากน้ำตาลที่กำจัดพิษ กากน้ำตาล กลูโคส ไซโลส กลีเซอรอล และซูโครส ตามลำดับ ซึ่งไอโซเลต DG2 สามารถใช้กลีเซอรอล และซูโครส ในการผลิตแคลเซียมมาเลตได้ปริมาณน้อย และเมื่อเพาะเลี้ยงไอโซเลต DG2 ในอาหาร Basic medium ที่ใช้กากน้ำตาลที่กำจัดพิษ (Detox-molasses) เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าไอโซเลต DG2 สามารถผลิตแคลเซียมมาเลตได้สูงสุด 48.98±0.00 กรัมต่อลิตร และมีค่าผลได้ (Yield) สูงสุดเท่ากับ 1.31±0.00 โมลต่อโมล ดังนั้นกากน้ำตาลที่กำจัดพิษ (Detox-molasses) จึงเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีความเหมาะสมต่อการผลิตแคลเซียมมาเลตของไอโซเลต DG2 เนื่องจากกากน้ำตาลประกอบด้วย Fe^{2+} และ Mn^{2+} ในปริมาณมากซึ่งอาจส่งผลต่อการเจริญของเซลล์และลดการผลิตกรดมาลิคลง (Kim และคณะ, 2015) ดังนั้นหากกำจัดโลหะไอออนออกไปจะทำให้การผลิตกรดมาลิคได้ดียิ่งขึ้น นอกจากนี้มีรายงานการวิจัยของ Ashraf และคณะ (2015) พบว่ากากน้ำตาลประกอบด้วยน้ำตาลหลายชนิด เช่น กลูโคส ซูโครส และฟรุคโตส เป็นต้น และมีแหล่งไนโตรเจน เช่น เปปโตน และแอมโมเนียม เป็นต้น ที่เป็นองค์ประกอบสำคัญของกรดอะมิโนซึ่งเป็นองค์ประกอบของโปรตีนที่มีอยู่ในกากน้ำตาล ซึ่งเหมาะต่อการเจริญของเซลล์ อีกทั้งยังมีโลหะไอออนซึ่งเป็นปัจจัยหนึ่งในการผลิตกรดมาลิคอีกด้วย แต่ในบางกรณีหากมีโลหะไอออนในปริมาณมากอาจทำให้เกิดความเป็นพิษในอาหารและส่งผลให้เซลล์หยุดการเจริญและตายลงได้ในที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.2 การศึกษาผลของชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดมาลิคของไอโซเลต FX1

ทำการศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมโดยใช้สูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดมาลิคจากผลการทดลองหัวข้อ 4.1.2 คือ อาหารสูตร Calcium malate production ปริมาตร 30 มิลลิลิตร และใช้หัวเชื้อร้อยละ 5 โดยปริมาตรซึ่งมีค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.894 และใช้แหล่งคาร์บอนที่ต่างกัน คือ กลูโคส ไซโลส กลีเซอรอล ซูโครส กากน้ำตาล (Molasses) และกากน้ำตาลที่กำจัดพิษ (Detox-molasses) โดยใช้ปริมาณแหล่งคาร์บอน 100, 100, 102, 98, 200 และ 200 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ นำไปเลี้ยงที่สภาวะเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นเก็บตัวอย่างวันที่ 0 และวันที่ 6 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 9,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกตะกอนเซลล์ และแคลเซียมคาร์บอเนตออก นำส่วนใสที่ได้มาวิเคราะห์หาปริมาณแคลเซียมมาเลตด้วยวิธีการไทเทรต ตรวจสอบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS และตรวจวัดปริมาณน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธี Phenol-sulphuric acid และตรวจสอบพีเอชด้วยเครื่องวัดพีเอช (pH meter) ผลการทดลองที่ได้แสดงดังตารางที่ 4.6

จากตารางที่ 4.6 แสดงปริมาณแคลเซียมมาเลต ผลได้ ปริมาณแหล่งคาร์บอนเริ่มต้น ปริมาณแหล่งคาร์บอนที่เหลือ และพีเอช เมื่อเพาะเลี้ยงไอโซเลต FX1 ในอาหาร Calcium malate production ที่มีแหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน ได้แก่ กลูโคส ไซโลส กลีเซอรอล ซูโครส กากน้ำตาล (Molasses) และกากน้ำตาลกำจัดพิษ (Detox-molasses) ตามลำดับ นอกจากนี้ได้มีการเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลที่เหลือ ค่าพีเอช ของไอโซเลต FX1 เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 6 วัน และเปรียบเทียบปริมาณแคลเซียมมาเลตที่ผลิตได้ และผลได้เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร Calcium malate production ที่มีแหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน ดังรูปที่ 4.10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.6 แสดงปริมาณแคลเซียมมาเลต ผลได้ ปริมาณแหล่งคาร์บอนเริ่มต้น ปริมาณแหล่งคาร์บอนที่เหลือ และค่าพีเอช เมื่อเพาะเลี้ยงไอโซเลต FX1 ในอาหาร Calcium malate production ที่มีแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ เป็นระยะเวลา 6 วัน

Isolate	Condition				Yield (mol/mol)	pH	
	Carbon source	Initial Concentration of carbon source (g/l)	Final Concentration of carbon source (g/l)	Concentration of calcium malate (g/l)		initial	Final
FX1	Glucose	103.23±2.31	8.70±0.09	41.20±1.21	0.46±0.12	6.7	6.7
	Xylose	83.08±0.63	7.26±0.30	43.68±0.32	0.51±0.00	6.6	5.5
	Glycerol	-	-	1.19±0.01	-	7.1	6.7
	Sucrose	137.40±5.85	124.97±6.20	1.75.±0.13	0.29±0.02	6.9	7.0
	Molasses	278.43±1.77	201.65±0.67	53.05±0.39	0.73±0.00	6.0	6.4
	Detox-Molasses	203.92±8.07	106.94±0.68	51.09±0.38	0.55±0.00	6.1	6.7

จากตารางที่ 4.6 แสดงปริมาณน้ำตาลที่เหลือ ค่าพีเอชเริ่มต้นและค่าพีเอชในวันสุดท้ายของไอโซเลต FX1 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร Calcium malate production ที่มีแหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน คือ กลูโคส ไซโลส กลีเซอรอล ซูโครส กากน้ำตาล (Molasses) และกากน้ำตาลที่กำจัดพิษ (Detox-molasses) พบว่า เมื่อใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนเริ่มต้น 103.23 กรัมต่อลิตร หลังจากการเพาะเลี้ยงไอโซเลต FX1 เป็นระยะเวลา 6 วัน พบว่าปริมาณน้ำตาลกลูโคสลดลงเหลือ 8.70±0.09 กรัมต่อลิตร และเมื่อพิจารณาจากค่าพีเอชพบว่าพีเอชของน้ำเลี้ยงมีค่าคงที่จากวันที่ 1 ซึ่งมีค่าพีเอชเท่ากับ 6.7

เมื่อใช้น้ำตาลไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอน ภายหลังจากการทำการเพาะเลี้ยงไอโซเลต FX1 เป็นระยะเวลา 6 วัน พบว่าปริมาณน้ำตาลไซโลสลดลงเหลือ 7.26±0.30 กรัมต่อลิตร และเมื่อพิจารณาจากค่าพีเอชพบว่าพีเอชของน้ำเลี้ยงมีค่าลดลงจากวันที่ 1 โดยมีค่าพีเอชเท่ากับ 5.5 ซึ่งเป็นค่าพีเอชต่ำสุดเมื่อเทียบกับอาหารที่ใช้แหล่งคาร์บอนชนิดอื่นๆ

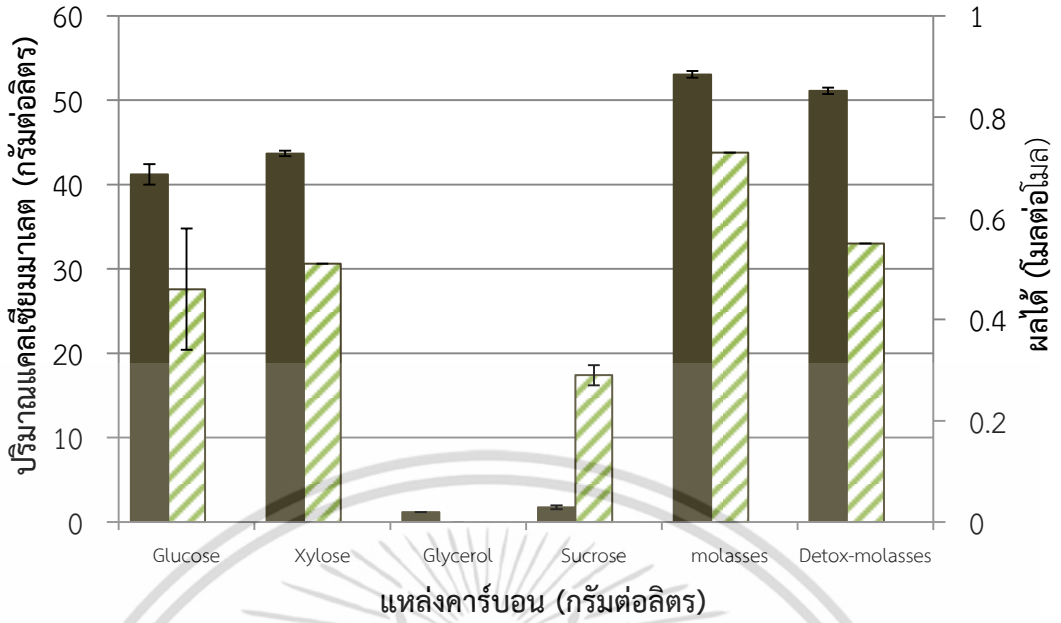
เมื่อใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน ภายหลังจากการทำการเพาะเลี้ยงไอโซเลต FX1 เป็นระยะเวลา 6 วัน พบว่าสามารถผลิตกรดมาลิคในรูปของแคลเซียมมาเลตได้ปริมาณ 1.19±0.01 กรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นปริมาณที่ค่อนข้างน้อย อาจเนื่องมาจากไอโซเลต FX1 สามารถใช้กลีเซอลรอลในการเจริญหรือผลิตแคลเซียมมาเลตได้น้อย และเมื่อพิจารณาจากค่าพีเอชพบว่าพีเอชของน้ำเลี้ยงมีค่าลดลงจากวันที่ 1 ซึ่งมีค่าพีเอชเท่ากับ 6.7

เมื่อใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน ภายหลังจากการทำการเพาะเลี้ยงไอโซเลต FX1 เป็นระยะเวลา 6 วัน พบว่าปริมาณน้ำตาลซูโครสลดลงเหลือ 124.97±6.20 กรัมติอลิตร และเมื่อพิจารณาจากค่าพีเอชพบว่าพีเอชของน้ำเลี้ยงมีค่าเพิ่มขึ้นจากวันที่ 1 เล็กน้อย ซึ่งมีค่าพีเอชเท่ากับ 7.0

เมื่อใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน ภายหลังจากการทำการเพาะเลี้ยงไอโซเลต FX1 เป็นระยะเวลา 6 วัน พบว่าปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในกากน้ำตาล (Molasses) ลดลงเหลือ 201.65±0.67 กรัมต่อลิตร และเมื่อพิจารณาจากค่าพีเอชพบว่าพีเอชของน้ำเลี้ยงมีค่าเพิ่มขึ้นจากวันที่ 1 ซึ่งมีค่าพีเอชเท่ากับ 6.4

เมื่อใช้กากน้ำตาลที่กำจัดพิษ (Detox-molasses) เป็นแหล่งคาร์บอน ภายหลังจากการทำการเพาะเลี้ยงไอโซเลต FX1 เป็นระยะเวลา 6 วัน พบว่าปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในกากน้ำตาลที่กำจัดพิษ ลดลงเหลือ 106.94±0.68 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีการใช้ปริมาณแหล่งคาร์บอนสูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับแหล่งคาร์บอนชนิดอื่นๆ และเมื่อพิจารณาจากค่าพีเอชพบว่าพีเอชของน้ำเลี้ยงมีค่าเพิ่มขึ้นจากวันที่ 1 ซึ่งมีค่าพีเอชเท่ากับ 6.7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.10 แสดงปริมาณของแคลเซียมมาเลตที่ผลิตได้ และผลได้ของไอโซเลต FX1 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร Calcium malate production ที่มีชนิดของแหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 6 วัน โดย ■ คือปริมาณแคลเซียมมาเลตที่ผลิตได้ และ ▨ คือผลได้

จากรูปที่ 4.10 แสดงปริมาณแคลเซียมมาเลตที่ผลิตได้ และผลได้ของไอโซเลต FX1 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร Calcium malate ที่มีแหล่งคาร์บอนต่างชนิดกัน คือ กลูโคส ไซโลส กลีเซอรอล ซูโครส กากน้ำตาล (Molasses) และกากน้ำตาลที่กำจัดพิษ (Detox-molasses) พบว่าไอโซเลต FX1 สามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้ทั้งหมด 6 ชนิด โดยเรียงตามปริมาณแคลเซียมมาเลตที่ผลิตได้จากมากไปน้อย ดังนี้ คือ กากน้ำตาล กากน้ำตาลกำจัดพิษ ไซโลส กลูโคส ซูโครส และกลีเซอรอล ตามลำดับ แต่เมื่อใช้กลีเซอรอล และซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยงไอโซเลต FX1 สามารถผลิตแคลเซียมมาเลตได้ปริมาณค่อนข้างน้อย จึงอาจไม่เหมาะสมต่อการผลิตกรดมาลิค เพราะทำให้ไม่คุ้มกับต้นทุนในการผลิต และได้ผลตอบแทนต่ำ และเมื่อเพาะเลี้ยงไอโซเลต FX1 ในอาหาร Calcium malate production ที่มีกากน้ำตาล (Molasses) เป็นแหล่งคาร์บอน ไอโซเลต FX1 สามารถผลิตแคลเซียมมาเลตได้สูงสุด 53.05±0.39 กรัมต่อลิตร และมีค่าผลได้ (Yield) สูงสุดเท่ากับ 0.73±0.00 โมลต่อโมล ดังนั้นกากน้ำตาลจึงมีความเหมาะสมต่อการผลิตแคลเซียมมาเลตของไอโซเลต FX1 ซึ่งการใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน มีข้อดี คือ ให้ผลผลิตในปริมาณสูง สามารถลดต้นทุนการผลิตได้ ลดขั้นตอนการกำจัดพิษ ช่วยให้ประหยัดทั้งเวลาและทรัพยากร อีกทั้งยังเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมอีกด้วย ซึ่งกากน้ำตาลประกอบไปด้วย น้ำร้อยละ 25 โดยมวล ซูโครส ร้อยละ 35 โดยมวล กลูโคส และฟรุคโตสร้อยละ 10 โดยมวล คาร์โบไฮเดรตร้อยละ 2.5 โดยโดยมวล โปรตีนร้อยละ 4.3 โดยมวล ไขมันร้อยละ 0.06 โดยมวล เถ้าร้อยละ 9.6 โดยมวล เกลือร้อยละ 4.6 โดยมวล และแร่ธาตุต่างๆ ร้อยละ 8.9 โดยมวล เช่น Ca^{2+}, K^{+}, Na^{+}, Fe^{2+}, Mg^{2+} และ Cu^{2+} เป็นต้น ซึ่งสารอาหารเหล่านี้มีความจำเป็นต่อการเจริญของเซลล์ (Jiang และคณะ, 2009) และส่งผลให้สามารถผลิตกรดมาลิคได้เพิ่มสูงขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

1) จากการศึกษาชนิดของอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดมาลิค พบว่าไอโซเลต DG2 สามารถผลิตกรดมาลิคที่อยู่ในรูปแคลเซียมมาเลตได้ค่าผลได้ (Yield) สูงสุด 0.63 โมลต่อโมล เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร Basic medium และใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน สำหรับไอโซเลต FX1 สามารถผลิตกรดมาลิคที่อยู่ในรูปแคลเซียมมาเลตได้ค่าผลได้ (Yield) สูงสุด 0.50±0.01 โมลต่อโมล เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร Calcium malate production และใช้ไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอน

2) จากการศึกษาอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดมาลิค พบว่าอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่แตกต่างกันไม่มีผลต่อการผลิตกรดมาลิคที่อยู่ในรูปแคลเซียมมาเลตของไอโซเลต DG2 อย่างมีนัยสำคัญ สำหรับไอโซเลต FX1 สามารถผลิตกรดมาลิคที่อยู่ในรูปแคลเซียมมาเลตได้ค่าผลได้สูงสุด 0.67±0.02 โมลต่อโมล เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร Calcium malate production ที่มีอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 100:1

3) จากการศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดมาลิค พบว่าไอโซเลต DG2 สามารถผลิตกรดมาลิคที่อยู่ในรูปแคลเซียมมาเลตได้ค่าผลได้ (Yield) สูงสุด 1.31 โมลต่อโมล เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร Basic medium ที่มีกากน้ำตาลที่กำจัดพิษแล้วเป็นแหล่งคาร์บอน สำหรับไอโซเลต FX1 สามารถผลิตกรดมาลิคที่อยู่ในรูปแคลเซียมมาเลตได้ผลได้ (Yield) สูงสุด 0.73 โมลต่อโมล เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร Calcium malate production ที่มีกากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน

5.2 ข้อเสนอแนะ

1) จากการศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียเพื่อให้ผลิตกรดมาลิคได้สูงพบว่าสามารถใช้กากน้ำตาลได้ดีที่สุด ดังนั้นในการศึกษาต่อไปอาจจะศึกษาปริมาณของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดมาลิค

2) ศึกษาปัจจัยอื่นๆที่เกี่ยวข้องและส่งผลต่อการเจริญของแบคทีเรียและการผลิตกรดมาลิค เช่น อุณหภูมิในการเพาะเลี้ยง และความเร็วรอบในการเขย่า เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

ชัชษฎาภา พุทโธสิทธิ์, ณัฐริกา อธิษฐานรัตน์, อลิสรา บุญก่อเกื้อ และอังคณา ไชยเสนา. 2558. **“การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสาร Building Block (กรดอะดิพิคและกรดมาลิค) โดยแบคทีเรียที่คัดแยกได้”** โครงงานพิเศษระดับวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรมบัณฑิตวิทยาลัย. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ. 2544. **“จุลชีววิทยาทั่วไป.”** พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ประภัสสร เทพกัณฑ์ และสุพรรณิกา ยอดสง่า. 2557. **“การคัดแยกจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตกรดอะดิพิคจากแหล่งธรรมชาติ.”** โครงงานพิเศษระดับวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม บัณฑิตวิทยาลัย, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

พาณิพัค วารุณศาสตร์, พิมพ์พร สนเทศ และวิลาวัลย์ ชาวเมืองแมน. 2558. **“การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดมาลิคจากแบคทีเรียที่คัดแยกได้.”** โครงงานพิเศษระดับวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม บัณฑิตวิทยาลัย, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

สุขใจ ชูจันทร์. 2554. **“การผลิตกรดอินทรีย์จากวัสดุเหลือใช้มวลชีวภาพ.”** พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงณ์มหาวิทยาลัย.

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 Biochemical Engineering and Biotechnology.* 111 : 99-147.

Ashraf, S. Ali, S. and Hac, I.U. 2015. **“Pre-treatment of raw sugarcane molasses by metal complexing agents for improved citric acid fermentation by *Aspergillus niger*.”** *International Journal of Research in Pharmac and Biosciences.* 2(6) : 34-40.

Bakker, B. M. Overkamp, K. M. van Maris, A. J. Kotter, A. P. M. Luttik, A. H. Dijken, J. P. van and Pronk, J. T. 2001. **“Stoichiometry and compartmentation of NADH metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*.”** *FEMS Microbiology Reviews.* 25 : 15–37.

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.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Brown, S.H. Bashkirova, L. Berka, R. Chandler, T. Doty, T. McCall, K. McCulloch, M. McFarland, S. Thompson, S. Yaver, D. and Berry, A. 2013. **"Metabolic engineering of *Aspergillus oryzae* NRRL 3488 for increased production of l-malic acid."** *Applied Microbiology and Biotechnology.* 97 : 8903–8912.

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, 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

Chi, Z. Liu, G.L. Liu, C.G. and Chi, Z.M. 2016. **"Poly(β-L-malic acid) (PMLA) from *Aureobasidium* spp. and its current proceedings."** *Applied Microbiology and Biotechnology.* 100 : 3841–3851.

Christensen, T. Woeldike, H. Boel, E. Mortensen, S.B. Hjortshoej, K. Thin, L. and Hansen, M.T. 1988. **"High level expression of recombinant genes in *Aspergillus oryzea*."** *Biotechnology.* 6 : 1419-1422.

Dakin, H. D. 1924. **"The formation of l-malic acid as a product of alcoholi fermentation by yeast."** *Journol Biology Chemical.* 61 : 139–145.

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.

Doyle, E.M. 1999. **"Use of organic acids to control *Listeria* in meat."** *American Meat Institute Foundation*. 651(1) : 1-39.

Dubois, M. Gilles, K.A. Hamilton, J.K. Rebers, P.A. Smith, F. 1956. **"Colorimetric method for determination of sugars and related substances."** *Analysis Chemical.* 28 : 350–356.

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 Biotechnol*ogy. 19 : 427–429.

Fernandez, O. Béthencourt, L. Quero, A. Sangwan, R.S. and Clément, C. 2010. **"Trehalose and plant stress responses: Friend or foe**." *Trends Plant Science*. 15 : 409–417.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Food And Agriculture Organization Of The United Nations. 2006. **"Combined compendium of food additive specification 67th."** Italy : Viale delle Terme di Caracalla.

Gardner, W.H. 1966. **"Food acidulants."** New York : *Allied Chemical Corporation*.

Garrett, H. Reginald, Grisham and M. Charles, 2008. **"Biochemistry 4th edition."** Boston : Twayne Publishers.

Geiser, D. M. Pitt, J. I. and Taylor, J. W. 1998. **"Cryptic speciation and recombination in the aflatoxin-producing fungus *Aspergillus flavus*."** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 95 : 388–393.

Goldberg, I. Rokem, J.S. and Pines, O. 2006. **"Organic acids: Old metabolites, new themes."** *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 81 : 1601–1611.

Goldberg, I. Williams, R. 1991. **"Citric, fumaric and malic acids. In: Goldberg I, Williams R (eds)."** *Biotechnology and food ingredients*. Van Nostrand Reinhold, New York : 349–374.

Hahn-Hagerda, B. Karhumaa, K. Fonseca, C. and Gorwa-Graslund, M.F. 2007. **"Towards industrial pentose-fermenting yeast strains."** *Applied Microbiology Biotechnology*. 74(5) : 37-53

Helena, H. Silvia, T. Anna, P. Ludmila, K. and Michal, R. 2015. **"Bioconversion of fumaric acid to l-malic acid by the bacteria of the genus *Nocardia*."** *Applied Biochemistry and Biotechnology.* 75(1) : 266–273.

Heveker, A. Kuenz, A. and Vorlop, K.D. 2014. **"Filamentous fungi in microtiter plates—an easy way to optimize itaconic acid production."** *Applied Journal Microbiology and Biotechnology.* 98 : 6983-6989.

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 Biotechnoogyl*. 175 : 266-273.

Jackson, M.A. and Bothast, R.J. 1990. **"Carbon concentration and carbon-to-nitrogen ratio influence submerged-culture conidiation by the potential bioherbicide *Colletotrichum truncatum* NRRL 13737."** *Applied and Environmental Microbiology.* 56(11) : 3435-3438.

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.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Jiang, L. Wang, J. Liang, S. Wang, X. Cen, P. Xu, Z. 2009. **"Butyric acid fermentation in a fibrous bed bioreactor with immobilized *Clostridium tyrobutyricum* from cane molasses."** *Bioresource Technology*. 100 : 3403–3409.

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.

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, H.K. Lee, H.Y. and Lee, C.Y. 2015. **"Pretreatment of sugarcane molasses and citric acid production by *Candida zeylanoides."*** *Biotechnology*. 43(2) : 164-168.

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

Knuf, C. and Nookaew, I. 2014. **"Physiological characterization of the high malic acid producing *Aspergillus oryzae* strain 2103a-68."** *Applied Microbiology and Biotechnology.* 98 : 3517–3527.

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.

Kusch, S. Morar, M.V. 2009. **"Integration of lignocellulosic biomass into renewable energy generation concepts."** *ProEnvironment*. 2 : 32-37.

Leathers, T.D. and Manitchotpisit, P. 2013. **"Production of poly(β-L-malic acid) (PMA) from agricultural biomass substrates by *Aureobasidium pullulans*."** *Biotechnology Letters*. 35 : 83-89.

Lee, D.Y. Yun, H. Park, S. and Lee, S.Y. 2003. **"The management of metabolic reaction information and quantitative metabolic flux analysis."** *Bioinformatics.* 19 : 2144–2146.

Lee, P.C. Lee, S.Y. Lee, S.H. Hong, S.H. and Chang, H.N. 2002. **"Isolation and characterization of a new succinic acid-producing bacterium, *Mannheimia succiniciproducens* MBEL55E, from bovine rumen."** *Applied Microbiology and Biotechnology.* 58 : 663–668.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Li, X. Liu, Y. Yang, Y. Zhang, H. Wang, H. Wu, Y. Zhang, M. Sun, T. Cheng, J. Wu, X. Pan, L. Jing, S. and Wu, H. 2014. **"High levels of malic acid production by the bioconversion of corn straw hydrolyte using an isolated *Rhizopus delemar* strain."** *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 19 : 478-492.

Li, Y. Chi, Z. Wang, G.Y. Wang, Z.P. Liu, G.L. Lee, C.F. Ma, Z.C. and Chi, Z.M. 2015. **"Taxonomy of *Aureobasidium* spp. and biosynthesis and regulation of their extracellular polymers."** *CRC Critical Reviews in Microbiology.* 41 : 228–237

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.

Lumyong, S. Tomita, F. 1993. **"L-malic acid production by an albino strain *Monascus araneosus*."** *World Journal Microbiol Biotechnol.* 9 : 383-384.

Ma, Y. Wang, G.Y. Liu, G.L. Wang, Z.P. and Chi, Z.M. 2013. **"Overproduction of poly(beta-malic acid) (PMA) from glucose by a novel *Aureobasidium* sp. P6 strain isolated from mangrove system."** *Applied Microbiology and Biotechnology.* 97 : 8931–8939.

March, J. Brow, H.W. 2017. **"Carboxylic acid chemical compound."** *Encyclopaedia Britannica, Inc. 1 : 1-2.*

Mattern, I.E. Unkles, S. Kinghorn, J.R. Pouwels, P.H. and Hondel, V.D. 1987. **"Transformation of *Aspergillus oryzea* using the *A. niger pyr* gene."** *Molecular Genetics* and Genomics. 210 : 460-461.

Millard, C.S. Chao, Y.P.. Liao, J.C. and Donnelly, M.I. 1996. **"Enhanced production of succinic acid by overexpression of phosphoenolpyruvate carboxylase in *Escherichia coli*."** *Applied Environmental Microbiology.* 62 (5) : 1808–1810.

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.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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.

Nayunigri, K.M. Maity, A. Agarwal, S. and Gupta, K.V. 2016. **"Curcumin–malic acid based green copolymers for control of scale and microbiological growth applications in industrial cooling water treatment."** *Journal of Molecular Liquids.* (214) : 400-410.

Nexant. 2009. **Maleic anhydride.** [Online]. Available : http://www.chemsystems.com/reports/search/docs/abstracts/0708_8_abs.pdf. วันที่สืบค้น 12 มกราคม 2560.

Obendorf, R.L. and Kosina, S.M. 2011. **"Soluble carbohydrates in soybean. In: Ng, T.-B. (Ed.), soybean–biochemistry."** *Chemistry and Physiology.* 201–228.

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.

Okamoto, S. Chin, T. Kagata, K. Takahashi, T. Ohara, H. and Aso, Y. 2015. **"Production of itaconic acid in *Esherichia coli* expressing recombinant α-amylase using starch as substrate."** *Journal of Bioscience and Bioengineering.* 119(5) : 548-553.

Organic Gardening magazine. 2559. **"How to calculate the carbon-to-nitrogen ratio of your compost mix."** [Online]. Available : http://ucanr.edu/sites/mginyomono/files/170818.pdf. วันที่สืบค้น 12 มกราคม 2560.

Park, S.J. Park, J.P. and Lee, S.Y. 2002. **"Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of medium-chain-length polyhydroxyalkaroates rich in specific monomers."** *FEMS Microbiology Letters.* 214 : 217–222.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Peekhaus, N. and Conway, T. 1998. **"Positive and negative transcriptional regulation of the *Escherichia coli* gluconate regulon gene *gntT* by *GntR* and the cyclic AMP(cAMP)-cAMP receptor protein complex."** *Journal of Bacteriology.* 180(7) : 1777–1785.

Peleg, Y. Stieglitz, B. and Goldberg, I. 1988. **"Malic acid accumulation by *Aspergillus flavus*."** *Applied Microbiology and Biotechnology*. 28 : 69-75.

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 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.

Pitkanen, J.P. Aristidou, A. Salusiarvi, L. Ruohonen, L. and Penttila, M. 2003. **"Metabolic flux analysis of xylose metabolism in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* using continuous culture."** *Metabolic Engineering.* 5 : 16-31.

Rastogi, S.C. 2007. **"Bitoechnology."** *Principles and Applications.* Oxford, UK: Alpha Science International Ltd.

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

Sharma, N. Prasad, G.S. and Choudbmy, A.R. 2013. **"Utilization of corn steep liquor for biosynthesis of *pullulan,* an important exopolysaccharide."** *Carbon Polymer.* 93 : 95-101.

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.

Shuang, J.L. and Alexander, S. 1997. **"Production of poly(malic acid) from different carbon sources and its regulation in *Aureobasidium pullulans*."** *Biotechnology Letters.* 1 : 11–14.

Swiegers, J.H. Bartowsky, E.J. Henschke, P.A. and Pretorius, I.S. 2005. **"Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour."** *Australian Journal of Grape and Wine Research.* 11 : 139–173.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Tabuchi, T. Sugisawa, T. Lshidori, T. Nakahara, T. and Sugiyama, J. 1981. **"Itaconi acid fermentation by a yeast belonging to the genus *Cadida*."** *Journal of Agicultural 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.

Tanaka, A. Tosa, T. and Kobayashi, T. 1993. "**Industrial application of immobilized biocatalysts.**" New York : Marcel Dekker.

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

Thiemo, Z. Eda, S. Wiebke, K. Joerg, M. B. Guido, M. Nick, W. and Lars, M. B. 2016. **"Efficient malic acid production from glycerol with *Ustilago trichophora* TZ1."** *Biotechnology for Biofuels.* (9) : 67.

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, J. Lin, M. Xu, M. and Yang, S.T. 2016. **"Anaerobic fermentation for production of carboxylic acids as bulk chemicals from renewable biomass."** *Advances in Biochemical English Biotechnology.* 156 : 323-361.

Wang, X. Gong, C.S. and Tsao, G.T. 1998. **"Production of l-malic acid via biocatalysis employing wild-type and respiratory-deticient yeasts."** *Applied Journal Biochemistry and Biotechnology*. 70 : 845.

Wang, Z.P. Wang, G.Y. Khan, I. Chi, Z.M. 2013. "**High-level production of calcium malate from glucose by *Penicillium sclerotiorum* K302."** *Bioresource Thechnology*. 143 : 674-677.

Wei, P. Cheng, C. Lin, M. Zhou, Y. and Yang, S.T. 2017. **"Production of poly(malic acid) from sugarcane juice in fermentation by *Aureobasidium pullulans*: Kinetics and process economics."** *Bioresource Technology.* (224) : 581–589.

Werpy, T. and Petersen, G. 2004. **"Top value added chemicals from biomass."** *National Renewable Energy Laboratory*. (1) : 1.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

West, T.P. 2011. **"Malic acid production from thin stillage by *Aspergillus* species."** *Biotechnology Letters.* 33 : 2463-2467.

Xu, N. Zhang, W. Rch, S. Liu, F. Zhao, C. Liao, H. Xu, Z. Huarg, J. Li, Q. Tu, Y. Yu, B. Wang, Y. Jiang, J. Qin, J. and Peng, L. 2012. **"Hemicelluloses negatively affect lignocellulose crystallinity for high biomass digestibility under NaOH and H_2SO_4 pretreatment in *Miscanthus*."** *Biotechnology for Biofuels*. 58(5) : 6-12.

Zambanini, T. Sarikaya, E. Kienieberg, W. Buescher, J.M. Meurer, G. Wierckx, N. and Blank, L.M. 2016. **"Efficient malic acid production from glycerol with *Ustilago trichophora* TZ1."** *Biotechnology for Biofuel*. 67(9) : 1-8.

Zan, Z.Q. and Zou, X. 2013. **"Efficient production of poly malic acid from raw sweet potato hydrolysate with immobilized cells of *Aureobasidium pullulans* CCTCCM2012223 in aerobic fibrous bed bioreactor."** *Journal of Chemical Technology and Biotechnology.* 88 : 1822–1827.

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 (β-L-malic acid) with a new isolated *Aureobasidium pullulans* strain."** *Applied Journal Microbiology and Biotechnology.* 92 : 295-303.

Zhang, X. Wang, X., Shanmugam, K.T. Ingram, L.O. 2011b. **"L-Malate production by metabolically engineered *Escherichia coli*."** *Applied Environmentol Microbiology.* 77 : 427-434.

Zhe, C. Guang, L.L. Chen, G.L. and Zhen, M.C. 2016. **"Poly(β-L-malic acid) (PMLA) from *Aureobasidium* spp. and its current proceedings."** *Applied Microbiology Biotechnology*. 100 : 3841–3851.

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 อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก
สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. สูตรอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์

1.1 สูตรอาหารแข็ง Selective medium (Tabushi และคณะ, 1981)

Glucose หรือ Xylose	100	กรัมต่อลิตร
Yeast extract	5	กรัมต่อลิตร
KH_2PO_4	1	กรัมต่อลิตร
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.5	กรัมต่อลิตร
$CaCO_3$	10	กรัมต่อลิตร
Agar	20	กรัมต่อลิตร

1.2 สูตรอาหาร Shaker culture (Tabushi และคณะ, 1981)

Glucose หรือ Xylose	100	กรัมต่อลิตร
Yeast extract	1	กรัมต่อลิตร
KH_2PO_4	0.5	กรัมต่อลิตร
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.5	กรัมต่อลิตร
NH_4Cl	3	กรัมต่อลิตร
$CaCO_3$	30	กรัมต่อลิตร

1.3 อาหารเหลว Main culture (Ochsenreither และคณะ, 2014)

Glucose หรือ Xylose	100	กรัมต่อลิตร
KH_2PO_4	0.1	กรัมต่อลิตร
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.1	กรัมต่อลิตร
$(NH_4)_2SO_4$	1.2	กรัมต่อลิตร
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	60	กรัมต่อลิตร
$K_2PO_4 \cdot 3H_2O$	0.17	กรัมต่อลิตร
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.1	กรัมต่อลิตร
NaCl	5	กรัมต่อลิตร
$CaCO_3$	30	กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.4 อาหารเหลว Production medium (Zhang และคณะ, 2011)

Glucose หรือ Xylose	100	กรัมต่อลิตร
KH_2PO_4	0.1	กรัมต่อลิตร
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.1	กรัมต่อลิตร
KCl	0.5	กรัมต่อลิตร
$NaNO_3$	2	กรัมต่อลิตร
$CaCO_3$	30	กรัมต่อลิตร

1.5 อาหารเหลว Basic medium (Li และคณะ, 2014)

Glucose หรือ Xylose	100	กรัมต่อลิตร
KH_2PO_4	0.8	กรัมต่อลิตร
$(NH_4)_2SO_4$	2	กรัมต่อลิตร
$MgSO_4$	0.3	กรัมต่อลิตร
$ZnSO_4$	0.2	กรัมต่อลิตร
$CaCO_3$	30	กรัมต่อลิตร

1.6 อาหารเหลว Calcium malate production (Khan และคณะ, 2014)

Glucose หรือ Xylose	100	กรัมต่อลิตร
KH_2PO_4	0.1	กรัมต่อลิตร
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.1	กรัมต่อลิตร
KCl	0.5	กรัมต่อลิตร
Corn steep liquor	0.5	ร้อยละโดยปริมาตร
$CaCO_3$	30	กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข
การเตรียมสารเคมี

1. การเตรียมสารละลายมาตรฐานน้ำตาลกลูโคสหรือไซโลส

1. นำน้ำตาลกลูโคสหรือไซโลสไปอบที่อุณหภูมิ 60-70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นในเครื่องเดซิเคเตอร์ เป็นเวลา 30 นาที
2. ชั่งน้ำตาลกลูโคสหรือไซโลสปริมาณ 0.2 กรัม เติมน้ำกลั่นละลายน้ำตาลกลูโคสหรือไซโลสปริมาตร 100 มิลลิลิตร ลงในบีกเกอร์คนให้น้ำตาลละลาย เทน้ำตาลที่ละลายแล้วลงไปในขวดปรับปริมาตรขนาด 200 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 200 มิลลิลิตร
3. เตรียมสารละลายมาตรฐานกลูโคสหรือไซโลส ที่ความเข้มข้น 200, 400, 600, 800, 1000, 1200, 1400, 1600, 1800 และ 2000 ไมโครกรัมต่อลิตร จากสารละลายมาตรฐานน้ำตาลกลูโคสหรือไซโลส ที่ความเข้มข้น 2000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

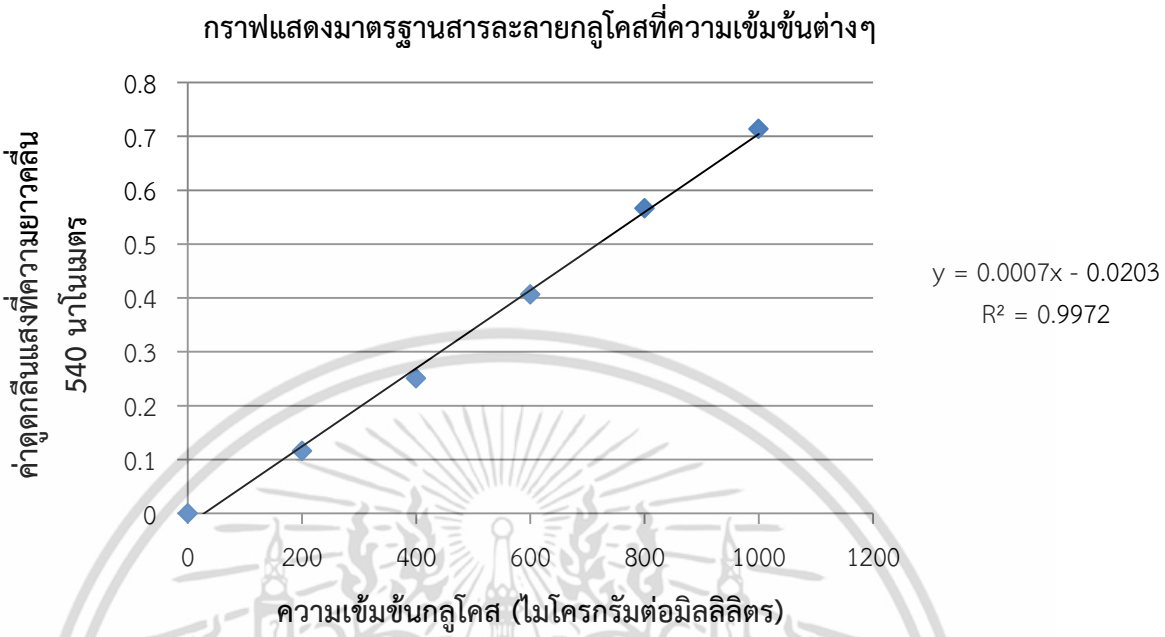
ตารางที่ ค1 การเตรียมสารละลายมาตรฐานกลูโคสหรือไซโลส ที่ความเข้มข้น 200, 400, 600, 800, 1000, 1200, 1400, 1600, 1800 และ 2000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกลูโคสหรือไซโลส (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	สารละลายมาตรฐานกลูโคสหรือไซโลส (มิลลิลิตร)	น้ำกลั่น (มิลลิลิตร)
0	0	5
200	0.5	4.5
400	1	4
600	1.5	3.5
800	2	3
1000	2.5	2.5
1200	3	2
1400	3.5	1.5
1600	4	1
1800	4.5	0.5
2000	5	0

4. นำสารละลายมาตรฐานกลูโคสหรือไซโลส ที่ความเข้มข้น 200, 400, 600, 800, 1000, 1200, 1400, 1600, 1800 และ 2000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

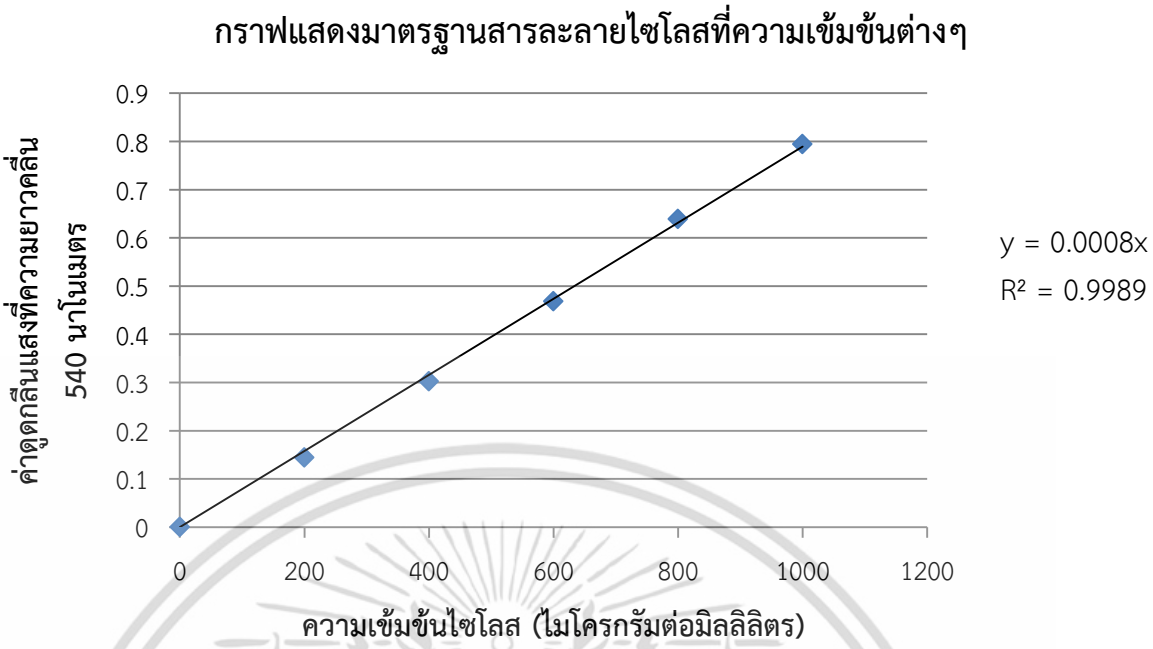
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. นำค่าที่วัดได้มาสร้างกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคสหรือไซโลส (จากรูปที่ 1 และ 2)



รูปที่ 1 : กราฟแสดงมาตรฐานสารละลายกลูโคสสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลที่เหลือ แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร และความเข้มข้นกลูโคส (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2 : กราฟแสดงมาตรฐานสารละลายไซโลสสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลที่เหลือ แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร และความเข้มข้นไซโลส (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

2. การเตรียมสารละลายฟีนอลที่ความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยมวลต่อปริมาตร

1. ชั่งสารฟีนอล 5 กรัม
2. ละลายสารฟีนอลลงในบีกเกอร์คนให้ละลายเข้ากันในน้ำกลั่นปริมาตร 50 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 100 มิลลิลิตร
3. การเตรียมสารละลายฟีนอลควรเตรียมใช้แต่ละอาทิตย์

ข้อควรระวัง ในการเตรียมสารละลายฟีนอล ควรทำในตู้ดูดควัน และสารพิษ (Hood) สวมถุงมือ แว่นตา และหน้ากาก (Mask) เพื่อป้องกันไอกรด และสารระเหย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. การเตรียมสารละลายกรดซัลฟิวริคความเข้มข้น 3 โมลาร์

เตรียมสารละลายกรดซัลฟิวริค (H_2SO_4) ความเข้มข้น 3 โมลาร์

สูตรโมเลกุล	H_2SO_4	
น้ำหนักมวลโมเลกุล (Mw)	98.08	กรัมต่อโมล
ความหนาแน่น (D)	1.84	กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร
ความเข้มข้นกรดซัลฟิวริค	98	ร้อยละโดยมวลต่อมวล

วิธีการคำนวณ

จากสูตร $\frac{10dx}{Mw}$ = ความเข้มข้น (M)

ดังนั้น ความเข้มข้น (M) = $\frac{(10)(1.84\ g/cm^3)(98\%)}{(98.08\ g/mol)}$

= 18.4 M

ดังนั้นกรดซัลฟิวริคความเข้มข้นร้อยละ 98 โดยมวลต่อมวลจะมีความเข้มข้นเท่ากับ 18.4 โมลาร์

ถ้าต้องการเตรียมสารละลายกรดซัลฟิวริค 3 โมลาร์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

จากสมการ $C_1V_1 = C_2V_2$

$18.4\ (V_1) = (3)(100)$

$V_1 = 300/18.4$

$V_1 = 16.30$ มิลลิลิตร

1. เติมสารละลายกรดซัลฟิวริคเข้มข้น 16.30 ลงในน้ำกลั่น ปริมาตร 50 มิลลิลิตร
2. ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

4. การเตรียมสารละลาย Ethylene Diamine Tetraacetic Acid ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์

เตรียมสารละลาย EDTA ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์

สูตรโมเลกุล	$C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2 \cdot 2H_2O$	
น้ำหนักมวลโมเลกุล (Mw)	372.24	กรัมต่อโมล
ความหนาแน่น (D)	850-1050	กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร

วิธีการคำนวณ

1 โมลาร์ ⟶ มี EDTA 372.24 กรัมต่อโมล

ถ้าต้องการเตรียม 0.05 โมลาร์ ⟶ ต้องชั่ง EDTA เท่าไร

= $\frac{0.05\ \text{โมลาร์} \times 372.24\ \text{กรัมต่อโมล}}{1\ \text{โมลาร์}}$

= 18.612 กรัม

1. ชั่ง EDTA 18.612 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น
2. ปรับปริมาตรให้เป็น 1000 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. การเตรียมสารละลายกรดไฮโดรคลอริค 2.7 โมลาร์

สูตรโมเลกุล	HCl	
น้ำหนักมวลโมเลกุล (Mw)	36.5	กรัมต่อโมล
ความหนาแน่น (D)	1.18	กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร
ความเข้มข้นกรดซัลฟิวริค	37	ร้อยละโดยมวลต่อมวล

จากสมการ $\frac{10dx}{Mw}$ = ความเข้มข้น (โมลาร์)

ดังนั้น ความเข้มข้น (โมลาร์) = $\frac{10 \times 1.18 \times 37}{36.5}$

= 11.9 โมลาร์

ดังนั้นกรดไฮโดรคลอริคความเข้มข้นร้อยละ 37 โดยมวลต่อมวลจะมีความเข้มข้นเท่ากับ 11.9 โมลาร์

ถ้าต้องการเตรียมสารละลายกรดไฮโดรคลอริค 2.7 โมลาร์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

จากสมการ $C_1V_1 = C_2V_2$

$11.9 (V_1) = (2.7)(1000)$

$V_1 = 226$ มิลลิลิตร

1. เติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริคความเข้มข้นร้อยละ 37 โดยมวลต่อมวล ลงในน้ำกลั่น ปริมาตร 500 มิลลิลิตร
2. ปรับปริมาตรให้ได้ 1000 มิลลิลิตร

ข้อควรระวัง ในการเตรียมสารละลายกรดไฮโดรคลอริคควรทำในตู้ดูดควัน และสารพิษ (Hood) สวมถุงมือ แว่นตา และหน้ากาก (Mask) เพื่อป้องกันไอกรด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6. การเตรียมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1.075 โมลาร์

สูตรโมเลกุล NaOH
น้ำหนักมวลโมเลกุล (Mw) 40 กรัมต่อโมล

ต้องการเตรียมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1.075 โมลาร์

โซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 โมล ชั่งสารมา 40 กรัม

ถ้าต้องการโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1.075 โมล ชั่งสารมา $= \frac{40 \times 1.075}{1}$

$= 43$ กรัม

ดังนั้นสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร มีโซเดียมไฮดรอกไซด์อยู่ 43 กรัม

ต้องการเตรียมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ชั่งสารมา $= \frac{43 \times 100}{1000}$

$= 4.3$ กรัม

1. ชั่งสารโซเดียมไฮดรอกไซด์ 4.3 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น ปริมาตร 50 มิลลิลิตร
2. ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

7. การคำนวณปริมาณแคลเซียมมาเลตจากการไทเทรตด้วยสารละลาย Ethylene Diamine Tetraacetic Acid (EDTA)

ปริมาตรน้ำเลี้ยง 20 มิลลิลิตร สามารถตกตะกอนแคลเซียมมาเลตได้ทั้งหมด 2.8679 กรัม

นำปริมาณตัวอย่างตะกอนสำหรับการไทเทรต = 0.2010 กรัม

ปริมาตร EDTA เมื่อทำการไทเทรตถึงจุดยุติ = 9.5 มิลลิลิตร

จากสมการ EDTA 1 มิลลิลิตร = แคลเซียมมาเลต 8.607 มิลลิกรัม สมการที่ (1)

ปริมาตร EDTA 9.5 มีแคลเซียมมาเลต $= \frac{8.607 \times 9.5}{1}$

$= 81.7665$ มิลลิกรัม

จากตัวอย่างตะกอน 0.2010 กรัม มีตะกอนแคลเซียมมาเลต 81.7665 มิลลิกรัม

ดังนั้นตะกอนตัวอย่างทั้งหมด 2.8679 กรัม มีตะกอนแคลเซียมมาเลต $= \frac{2.8679 \times 81.7665}{0.2010}$

$= 1172.4907$ มิลลิกรัม

จากปริมาตรน้ำเลี้ยง 20 มิลลิลิตร มีตะกอนแคลเซียมมาเลต 1172.4907 มิลลิกรัม

ถ้าหากปริมาตรน้ำเลี้ยง 1000 มิลลิลิตร มีตะกอนแคลเซียมมาเลต $= \frac{1172.4907 \times 1000}{20}$

$= 58624.5363$ มิลลิกรัม

ดังนั้นจะมีปริมาณแคลเซียมมาเลต 58624.5363 มิลลิกรัมต่อลิตร

เปลี่ยนหน่วยเป็น กรัมต่อลิตร

1000 มิลลิกรัม = 1 กรัม

58624.5363 มิลลิกรัม $= \frac{58624.5363 \times 1}{1000}$

$= 58.6245$ กรัม

ดังนั้นจะมีปริมาณแคลเซียมมาเลต 58.6245 กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 1 การคำนวณอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนโดยไอโซเลต DG2

	Calcium malate	Main culture	Basic	Production	Shaker
Glucose	100 g/L ⟶ 100 x 40% = 40%				
$(NH_4)_2SO_4$		1.2 g/L = 1.2 x 21.2121% = 0.2545 %	2 g/L = 2 x 21.2121% = 0.4242 %		
$NaNO_3$				2 g/L = 2 x 16.47% = 0.3294 %	
NH_4Cl					3 g/L = 3 x 53.5% = 1.6050 %
Corn steep liquor	5 ml/L = 5 x 30% = 1.5 %				
C/N Ratio	40/1.5 = 26.6667 : 1	40/0.2545 = 157.1709 : 1	40/0.4242 = 94.2951 : 1	40/0.3294 = 121.4329 : 1	40/1.6050 = 24.9221 : 1

คำนวณอัตราส่วน C:N

ไอโซเลต DG2 (ใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน)

1. %C ของ $C_6H_{10}O_6$

$C_6H_{10}O_6$ = (12x5)+(1x10)+(16x5)
= 60+10+80
= 150 g/mol

%C = $\frac{Mw\ (C_5) \times 100}{Mw\ (C_6H_{10}O_6)}$
= 60 x 100/ 150
= **40%**

2. %N ของ NH_4Cl

NH_4Cl = (14x1)+(1x4)+(35.5x1)
= 14+4+35.5
= **53.5%**

3. %N ของ $NaNO_3$

$NaNO_3$ = (23x1)+(14x1)+(16x3)
= 23+14+48
= 85 g/mol

%N = $\frac{Mw\ (C_5) \times 100}{Mw\ NaNO_3}$
= 14 x 100/ 85
= **16.47%**

4. %N ของ $(NH_4)_2SO_4$

$(NH_4)_2SO_4$ = (14x2)+(1x8)+(32x1)+(16x4)
= 28+8+32+64
= 132 g/mol

%N = $\frac{Mw\ (C_5) \times 100}{Mw\ (NH_4)_2SO_4}$
= 28 x 100/ 132
= **21.2121%**

5. %N ของ Corn steep liquor

%N = **30%**

(Liggett and koffler, 1948)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2 การคำนวณอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนโดยไอโซเลต FX1

	Calcium malate	Main culture	Basic	Production	Shaker
Glucose	100 g/L ⟶ 100 x 40% = 40%				
$(NH_4)_2SO_4$		1.2 g/L = 1.2 x 21.2121% = 0.2545 %	2 g/L = 2 x 21.2121% = 0.4242 %		
$NaNO_3$				2 g/L = 2 x 16.47% = 0.3294 %	
NH_4Cl					3 g/L = 3 x 53.5% = 1.6050 %
Corn steep liquor	5 ml/L = 5 x 30% = 1.5 %				
C/N Ratio	40/1.5 = 26.6667 : 1	40/0.2545 = 157.1709 : 1	40/0.4242 = 94.2951 : 1	40/0.3294 = 121.4329 : 1	40/1.6050 = 24.9221 : 1

คำนวณอัตราส่วน C:N

ไอโซเลต FX1 (ใช้น้ำตาลไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอน)

1. %C ของ $C_6H_{10}O_6$

$C_6H_{10}O_6$ = (12x5)+(1x10)+(16x5)

= 60+10+80

= 150 g/mol

%C = $\frac{\text{Mw } (C_5) \times 100}{\text{Mw } (C_6H_{10}O_6)}$

= 60 x 100/ 150

= **40%**

2. %N ของ NH_4Cl

NH_4Cl = (14x1)+(1x4)+(35.5x1)

= 14+4+35.5

= **53.5%**

3. %N ของ $NaNO_3$

$NaNO_3$ = (23x1)+(14x1)+(16x3)

= 23+14+48

= 85 g/mol

%N = $\frac{\text{Mw } (C_5) \times 100}{\text{Mw } NaNO_3}$

= 14 x 100/ 85

= **16.47%**

4. %N ของ $(NH_4)_2SO_4$

$(NH_4)_2SO_4$ = (14x2)+(1x8)+(32x1)+(16x4)

= 28+8+32+64

= 132 g/mol

%N = $\frac{\text{Mw } (C_5) \times 100}{\text{Mw } (NH_4)_2SO_4}$

= 28 x 100/ 132

= **21.2121%**

5. %N ของ Corn steep liquor

%N = **30%**

(Liggett and koffler, 1948)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้