การศึกษาสภาวะการเพาะเลี้ยงที่สามารถเพิ่มการผลิตกรดมาลิคโดยแบคทีเรียที่คัดแยกได้

STUDY ON CULTIVATED CONDITION TO IMPROVE THE PRODUCTION OF MALIC ACID FROM ISOLATED BACTERIA

ทับทิม กูลรัตน์
ลักษณียา ประสพพรรังสี
สุนิษา ดาวเรือง

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2559

การศึกษาสภาวะการเพาะเลี้ยงที่สามารถเพิ่มการผลิตกรดมาลิค โดยแบคทีเรียที่คัดแยกได้

STUDY ON CULTIVATED CONDITION TO IMPROVE THE PRODUCTION OF MALIC ACID FROM ISOLATED BACTERIA

ทับทิม กูลรัตน์
ลักษณียา ประสพพรรังสี
สุนิษา ดาวเรือง

b 00265629

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2559

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

STUDY ON CULTIVATED CONDITION TO IMPROVE THE PRODUCTION OF MALIC ACID FROM ISOLATED BACTERIA

THAPTHIM KUNRAT
LAKSANEEYA PRASOPPORNRUNGSEE
SUNISA DAORUEANG

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การศึกษาสภาวะการเพาะเลี้ยงที่สามารถเพิ่มการผลิตกรดมาลิคโดยแบคทีเรียที่คัดแยกได้ Study on Cultivated Condition to Improve the Production of Malic Acid from Isolated Bacteria
ชื่อนักศึกษา	นางสาวทับทิม กูลรัตน์ รหัสนักศึกษา 56051000 นางสาวลักษณียา ประสพพรรังสี รหัสนักศึกษา 56051059 นางสาวสุนิษา ดาวเรือง รหัสนักศึกษา 56051092
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 การศึกษาสภาวะการเพาะเลี้ยงที่สามารถเพิ่มการผลิตกรดมาลิคโดยแบคทีเรียที่คัดแยกได้

ชื่อนักศึกษา นางสาวทับทิม กูลรัตน์ รหัสนักศึกษา 56051000
นางสาวลักษณียา ประสพพรรังสี รหัสนักศึกษา 56051059
นางสาวสุนิษา ดาวเรือง รหัสนักศึกษา 56051092

ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)

ภาควิชา ชีววิทยา

คณะ วิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)

ปีการศึกษา 2559

อาจารย์ที่ปรึกษา ดร.สมพิศ สอนโยธา

บทคัดย่อ

โครงงานพิเศษนี้ได้ศึกษาผลของสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน และแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตกรดมาลิคที่อยู่ในรูปของแคลเซียมมาเลต โดยไอโซเลต AG2 และ NEW1 ซึ่งคัดแยกได้จากฝรั่งเน่า ผลการทดลองพบว่า ไอโซเลต AG2 สามารถผลิตแคลเซียมมาเลตได้สูงที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร basic medium โดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน 50:1 โดยผลิตได้เท่ากับ 58.17 ± 0.14 กรัมต่อลิตร โดยศึกษาผลของชนิดของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตแคลเซียมมาเลต โดยเปลี่ยนกลูโคส เป็น ไซโลส ซูโครส กลีเซอรอล กากน้ำตาลไม่ปรับสภาพ และกากน้ำตาลปรับสภาพ ในอาหาร basic medium จากผลการทดลอง พบว่าสามารถผลิตแคลเซียมมาเลตได้สูงที่สุดเท่ากับ 78.08 ± 6.35 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้กากน้ำตาลปรับสภาพเป็นแหล่งคาร์บอน ในขณะที่ไอโซเลต NEW1 สามารถผลิตแคลเซียมมาเลตได้สูงที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร calcium malate production ที่มีอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน 100:1 โดยผลิตได้เท่ากับ 138.18 ± 1.54 กรัมต่อลิตร และไอโซเลต NEW1 สามารถผลิตแคลเซียมมาเลตได้สูงที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร calcium malate production ที่มีกากน้ำตาลปรับสภาพเป็นแหล่งคาร์บอน โดยผลิตได้เท่ากับ 74.83 ± 1.47 กรัมต่อลิตร จากผลการทดลองพบว่าแบคทีเรียทั้ง 2 ไอโซเลต สามารถใช้กากน้ำตาลซึ่งเป็นผลพลอยได้จากโรงงานอุตสาหกรรม ดังนั้นกากน้ำตาลจึงเป็นวัตถุดิบที่ดีและมีราคาถูกที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการผลิตกรดมาลิคในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

คำสำคัญ : กรดมาลิค กากน้ำตาล แคลเซียมมาเลต สูตรอาหาร อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน แหล่งคาร์บอน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Study on Cultivated Condition to Improve the Production of Malic Acid from Isolated Bacteria		
Students	Miss Thapthim	Kunrat	Student ID 56051000
	Miss Laksaneeya	Prasoppornrungsee	Student ID 56051059
	Miss Sunisa	Daorueang	Student ID 56051092
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 carbon-to-nitrogen ratio and the influence of different carbon sources to malic acid production in calcium malate form by isolates AG2 and NEW1, which isolated from spoiled guava. The results shown that the isolate AG2 was produced the highest titer of calcium malate at 58.17 ± 0.14 g/L, when grown in basic medium using glucose as a carbon source at a carbon-to-nitrogen ratio of 50:1. To examine the influence of different carbon sources on calcium malate production, glucose was exchanged for xylose, sucrose, glycerol, non-pretreated molasses or pretreated molasses in the basic medium. The results found that the highest calcium malate titer were obtained at 78.08 ± 6.35 g/L, when using pretreated molasses as carbon source. While the isolate NEW1 was produce the highest titer of calcium malate at 138.18 ± 1.54 g/L, when grown in calcium malate production medium using glucose as a carbon source at a carbon-to-nitrogen ratio of 100:1. The isolate NEW1 was also produced the highest titer of calcium malate at 74.83 ± 1.47 g/L, when grown in calcium malate production medium containing pretreated molasses as a carbon source. In this study, malic acid in calcium malate form can be produced from molasses, a low-value byproducts from sugar manufacturing by both isolates. 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.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Keywords : Malic acid, Molasses, Calcium malate, Culture medium, Carbon-to-nitrogen ratio, Carbon source

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยความกรุณาและคำแนะนำจากท่านอาจารย์ที่ปรึกษา ดร.สมพิศ สอนโยธา ที่แนะนำแนวทางในการทำโครงงานพิเศษ ให้ความช่วยเหลือ ตลอดจนให้ความรู้และประสบการณ์ต่างๆ คณะผู้จัดทำจึงขอกราบขอบพระคุณ มา ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณท่านอาจารย์ประธานกรรมการสอบโครงงานพิเศษ ผศ.ดร.ดวงกมล เรือนงาม และท่านอาจารย์กรรมการสอบโครงงานพิเศษ อ.ธนาวดี ก่ออนันต์ ที่ให้คำแนะนำและตรวจสอบ พร้อมทั้งชี้แนะแนวทางในการทำโครงงานพิเศษนี้ให้มีความเรียบร้อยสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการภาควิชาชีววิทยาที่ช่วยอำนวยความสะดวกด้านอุปกรณ์และสารเคมีในการทำวิจัย ขอบคุณเจ้าหน้าที่ธุรการที่อำนวยความสะดวกในการติดต่อประสานงาน

สุดท้ายนี้ขอบคุณบิดา มารดา เพื่อน พี่ น้อง และทุกคนที่คอยให้ความช่วยเหลือ ตลอดจนโครงงานพิเศษนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ทับทิม กูลรัตน์
ลักษณียา ประสพพรรังสี
สุนิษา ดาวเรือง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ข
กิตติกรรมประกาศ ..... ง
สารบัญ ..... จ
สารบัญตาราง ..... ซ
สารบัญรูป ..... ฌ
บทที่ 1 บทนำ 1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ 1
1.2 วัตถุประสงค์ 2
1.3 ขอบเขต 2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 3
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 4
2.1 กรดมาลิค 4
2.2 การสังเคราะห์กรดมาลิคด้วยกระบวนทางชีวภาพ 5
2.2.1 การสังเคราะห์กรดมาลิคโดยการตรึงเอนไซม์ฟูมาเรส 5
2.2.2 การสังเคราะห์กรดมาลิคด้วยการตรึงเซลล์ 6
2.2.3 การสังเคราะห์กรดมาลิคด้วยกระบวนการหมักแบบเซลล์อิสระ 6
2.3 วิถีการผลิตกรดมาลิคด้วยจุลินทรีย์โดยกระบวนการทางชีวภาพ 8
2.3.1 การสังเคราะห์กรดมาลิคจากวิถีกรดซิตริค 9
2.3.2 การสังเคราะห์กรดมาลิคจากวิถีไกลออกซิเลต 11
2.3.3 การสังเคราะห์กรดมาลิคจากปฏิกิริยาแอนาเพอโรติค 12
2.4 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดมาลิค 13
2.4.1 ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนและองค์ประกอบอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตกรดมาลิค 13
2.4.2 อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C:N ratio) 17
2.4.3 ชนิดของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตกรดมาลิค 18
2.5 การประยุกต์ใช้กรดมาลิค 21
2.5.1 อุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม 21
2.5.2 การใช้เป็นสารคีเลต 21

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ
(ต่อ)

หน้า

2.5.3 อุตสาหกรรมการแพทย์ 22
2.5.4 อุตสาหกรรมการผลิตเครื่องสำอาง 22
บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย 23
3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ 23
3.2 สารเคมี 23
3.3 ขั้นตอนการดำเนินงาน 25
3.3.1 แบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษา 25
3.3.2 การเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรียตั้งต้น 25
3.3.3 ศึกษาผลของอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดมาลิค 25
3.3.4 ศึกษาผลของอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่อการผลิตกรดมาลิค 25
3.3.5 ศึกษาผลของชนิดของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตกรดมาลิค 26
3.3.5.1 วิธีการปรับสภาพกากน้ำตาล 27
3.3.6 ขั้นตอนการวิเคราะห์ปริมาณแคลเซียมมาเลต 27
3.3.6.1 วิธีการตกตะกอนแคลเซียมมาเลต 27
3.3.6.2 การวิเคราะห์ปริมาณแคลเซียมมาเลตด้วยวิธีการไทรเทรต 27
3.3.7 ขั้นตอนการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ซิ่งด้วยวิธี DNS 28
3.3.8 ขั้นตอนการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธีฟีนอลซัลฟูริค 28
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล 29
4.1 ผลของสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตกรดมาลิค 30
4.1.1 ผลของสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตกรดมาลิคของไอโซเลต AG2 31
4.1.2 ผลของสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตกรดมาลิคของไอโซเลต NEW1 34
4.2 ผลของอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่อการผลิตกรดมาลิค 40
4.2.1 ผลของอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่อการผลิตกรดมาลิคของไอโซเลต AG2 41
4.2.2 ผลของอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่อการผลิตกรดมาลิคของไอโซเลต NEW1 45

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ
(ต่อ)

หน้า

4.3 ผลของชนิดของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตกรดมาลิค 50
4.3.1 ผลของชนิดของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตกรดมาลิคไอโซเลต AG2 53
4.3.2 ผลของชนิดของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตกรดมาลิคไอโซเลต NEW1..... 55
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 60
5.1 สรุปผลการวิจัย 60
5.2 ข้อเสนอแนะ 60
เอกสารอ้างอิง 61
ภาคผนวก 68
ภาคผนวก ก 69
ภาคผนวก ข 71
ภาคผนวก ค 72
ภาคผนวก ง 80
ภาคผนวก จ 86

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

2.1 ผลความเข้มข้นสารตัวกลางต่อการผลิตดกรดมาลิคโดยเชื้อ *Zygosaccharomyces rouxii* V19 13
2.2 ผลความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้นต่อการผลิตกรดมาลิคโดย*เชื้อ Aureobasidium pullulans* ZX-10 15
2.3 ผลของการหมักต่อการผลิตกรดมาลิคโดย*เชื้อ Aureobasidium pullulans* ZX-10..... 16
2.4 การผลิตกรดมาลิคของเชื้อ *Aureobasidium pullulans* โดยใช้แหล่งคาร์บอน ที่แตกต่างกัน 20
4.1 แสดงผลของอาหารเลี้ยงเชื้อ 5 สูตร คือ shaker culture medium, main culture, calcium malate production, production medium และ basic medium ต่อปริมาณ แคลเซียมมาเลต ผลได้และอัตราการผลิตของไอโซเลต AG2 และ NEW1 ตามลำดับ..... 30
4.2 แสดงผลของอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่อปริมาณแคลเซียมมาเลต ผลได้ และอัตราการผลิตของไอโซเลต AG2 และ NEW1 เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5 และ 4 วัน ตามลำดับ 41
4.3 แสดงผลของชนิดของแหล่งคาร์บอนได้แก่ กลูโคส ไซโลส กากน้ำตาลไม่ปรับสภาพ กากน้ำตาลปรับสภาพ ซูโครส และกลีเซอรอล ต่อปริมาณแคลเซียมมาเลต ผลได้และ อัตราการผลิตของไอโซเลต AG2 และ NEW1 ตามลำดับ 52
ค 1 การเจือจางสารละลายกลูโคสมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ..... 72
ค 2 การเจือจางสารละลายกลูโคสมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ..... 73
ค 3 แสดงปริมาณกลูโคสที่เหลือของไอโซเลต AG2 เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหารชนิดต่างๆ 75
ค 4 แสดงปริมาณกลูโคสที่เหลือของไอโซเลต NEW1 เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหารชนิดต่างๆ. 76
ค 5 แสดงปริมาณกลูโคสที่เหลือของไอโซเลต AG2 เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหาร basic medium ที่มีอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่างๆ 77
ค 6 แสดงปริมาณกลูโคสที่เหลือของไอโซเลต NEW1 เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหาร calcium malate production ที่มีอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่างๆ 78
ค 7 แสดงปริมาณกลูโคสที่เหลือ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงไอโซเลต AG2 และ NEW1 ในอาหาร basic medium และ calcium malate production ที่มีชนิดของแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน ตามลำดับ..... 79

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

2.1 แสดงโครงสร้างของ D และ L form ของกรดมาลิค 4
2.2 แสดงปฏิกิริยาในวิถีกรดซิตริค 10
2.3 แสดงปฏิกิริยาในวิถีไกลออกซิเลต 11
2.4 แสดงปฏิกิริยาแอนนาเพอโรติค 12
4.1 แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาของไอโซเลต AG2 (A) และ NEW1 (B) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยายรวม 1000 เท่า 29
4.2 กราฟแสดงปริมาณกลูโคสที่เหลือ (A) และค่าพีเอช (B) ที่เวลาต่างๆ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงไอโซเลต AG2 ในสูตรอาหาร shaker culture medium (△) main culture (●) calcium malate production (▲) production medium (□) และ basic medium (◇) 33
4.3 กราฟแสดงปริมาณแคลเซียมมาเลต และผลได้เมื่อทำการเพาะเลี้ยงไอโซเลต AG2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 5 สูตร คือ shaker culture medium (สูตรC) main culture (สูตร1) calcium malate production (สูตร2) production medium (สูตร3) และbasic medium (สูตร4) เป็นเวลา 5 วัน โดย ■ คือ ปริมาณแคลเซียมมาเลต (กรัมต่อลิตร) และ ▨ คือ ผลได้ (โมลต่อโมล) 34
4.4 กราฟแสดงปริมาณกลูโคสที่เหลือ (A) และค่าพีเอช (B) ที่เวลาต่างๆ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงไอโซเลต NEW1 ในสูตรอาหาร shaker culture medium (△) main culture (●) calcium malate production (▲) production medium (□) และ basic medium (◇) 37
4.5 กราฟแสดงปริมาณแคลเซียมมาเลต และผลได้เมื่อทำการเพาะเลี้ยงไอโซเลต NEW1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 5 สูตร คือ shaker culture medium (สูตรC) main culture (สูตร1) calcium malate production (สูตร2) production medium (สูตร3) และbasic medium (สูตร4) เป็นเวลา 5 วัน โดย ■ คือ ปริมาณแคลเซียมมาเลต (กรัมต่อลิตร) และ ▨ คือ ผลได้ (โมลต่อโมล) 38
4.6 กราฟแสดงปริมาณกลูโคสที่เหลือ (A) และค่าพีเอช (B) ที่เวลาต่างๆ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงไอโซเลต AG2 ในอาหาร basic medium ที่มีอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 50:1 (△) 75:1 (●) 100:1 (◆) 125:1 (□) 150:1 (▲) และ 200:1 (○) 44
4.7 กราฟแสดงปริมาณแคลเซียมมาเลต และผลได้ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงไอโซเลต AG2 ในอาหาร basic medium ที่มีอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 50:1 75:1 100:1 125:1 150:1 และ 200:1 เป็นเวลา 5 วัน โดย ■ คือ ปริมาณแคลเซียมมาเลต (กรัมต่อลิตร) และ ▨ คือ ผลได้ (โมลต่อโมล) 45

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

(ต่อ)

รูปที่ **หน้า**

4.8 กราฟแสดงปริมาณกลูโคสที่เหลือ (A) และค่าพีเอช (B) ที่เวลาต่างๆ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงไอโซเลต NEW1 ในอาหาร calcium malate production ที่มีอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 10:1 (△) 20:1 (●) 30:1 (◆) 40:1 (□) 50:1 (▲) และ 100:1 (○)..... 48

4.9 กราฟแสดงปริมาณแคลเซียมมาเลต และผลได้ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงไอโซเลต NEW1 ในอาหาร calcium malate production ที่มีอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 10:1 20:1 30:1 40:1 50:1 และ 100:1 เป็นเวลา 4 วัน โดย ■ คือ ปริมาณแคลเซียมมาเลต (กรัมต่อลิตร) และ ▨ คือ ผลได้ (โมลต่อโมล)..... 49

4.10 กราฟแสดงปริมาณแคลเซียมมาเลต และผลได้เมื่อทำการเพาะเลี้ยงไอโซเลต AG2 ในอาหาร basic medium ที่มี กลูโคส ไซโลส กากน้ำตาลไม่ปรับสภาพ กากน้ำตาลปรับสภาพ ซูโครส และกลีเซอรอล เป็นแหล่งคาร์บอน เป็นระยะเวลา 5 วัน โดย ■ คือ ปริมาณแคลเซียมมาเลต (กรัมต่อลิตร) และ ▨ คือ ผลได้ (โมลต่อโมล)..... 54

4.11 กราฟแสดงปริมาณแคลเซียมมาเลต และผลได้ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงไอโซเลต NEW1 ในอาหาร calcium malate production ที่มี กลูโคส ไซโลส กากน้ำตาลไม่ปรับสภาพ กากน้ำตาลปรับสภาพ ซูโครส และกลีเซอรอล เป็นแหล่งคาร์บอน เป็นระยะเวลา 5 วัน โดย ■ คือ ปริมาณแคลเซียมมาเลต (กรัมต่อลิตร) และ ▨ คือ ผลได้ (โมลต่อโมล)..... 56

จ1 รูปแสดงลักษณะตะกอนแคลเซียมมาเลตที่ได้จากการเพาะเลี้ยงไอโซเลต AG2 (A) และ NEW1 (B) ในอาหาร basic medium และ calcium malate production ตามลำดับ โดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน..... 86

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญ/ที่มาของโครงงานพิเศษ

กรดมาลิคจัดอยู่ในสารประเภท C_4 dicarboxylic และเป็น 1 ใน 12 สารเคมีที่สามารถผลิตได้จากน้ำตาลโดยกระบวนการทางชีวภาพหรือเคมี ที่สามารถใช้เป็นสาร Building-Block ในการสังเคราะห์สารอื่นๆที่มีมูลค่าสูงเพื่อลดต้นทุนในการผลิตได้ (Werpy และคณะ, 2004) ซึ่งกรดมาลิคนั้นมีคุณสมบัติเป็น Building-Block ที่มีประสิทธิภาพดีและสามารถนำไปใช้งานได้หลากหลาย เช่น ใช้เป็นสารตัวกลางของวัสดุชีวภาพในการสังเคราะห์สาร Maleic anhydride และ Tetrahydrofuran (Sauer และคณะ, 2008) อุตสาหกรรมพลาสติกย่อยสลายได้ (Goldberg และคณะ, 2006) และเป็นสารตัวกลางในกระบวนการเมทตาบอลิซึมของเซลล์ โดยในธรรมชาติส่วนใหญ่จะพบได้ในผลไม้ เช่น แอปเปิ้ล และพืชบางชนิด (Peleg และคณะ, 1988) ในปัจจุบันพบว่ามีความต้องการใช้กรดมาลิคในระดับอุตสาหกรรมเพิ่มมากขึ้น โดยถูกนำไปใช้มากทั้งในอุตสาหกรรมสารปรุงแต่งอาหาร อุตสาหกรรมเครื่องดื่ม อุตสาหกรรมยา ซึ่งในอุตสาหกรรมอาหารนั้นมีการนำกรดมาลิคมาใช้แทนกรดซิตริค เนื่องจากให้รสชาติที่เปรี้ยวกลมกล่อมมากกว่ากรดซิตริค (Battat และคณะ, 1991)

การผลิตกรดมาลิคมี 2 วิธีหลักๆ คือ 1.การสังเคราะห์ด้วยวิธีทางเคมี โดยใช้กรดมาเลอิคและกรดฟูมาริคทำปฏิกิริยาไฮเดรชั่น จากนั้นใช้ความร้อนและความดันสูงเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา แต่การสังเคราะห์ด้วยวิธีทางเคมีนั้นไม่ได้รับความนิยม เนื่องจากกรดฟูมาริคที่เป็นสารตั้งต้นมีราคาแพงจึงส่งผลให้ต้นทุนในการผลิตสูง และในระหว่างกระบวนการการผลิตมีการปล่อยมลภาวะออกสู่สิ่งแวดล้อมจากการใช้พลังงานความร้อนเพื่อเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ซึ่งส่งผลให้เกิดภาวะโลกร้อนได้ (Nordell, 2003) และก่อให้เกิดการสะสมของสารพิษที่เป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิต หากได้รับในปริมาณมากก็จะทำให้เกิดผลกระทบต่อสุขภาพอีกด้วย (Damalas และ Eleftherohorinos, 2011) 2.การสังเคราะห์ด้วยวิธีทางชีวภาพ เช่น การใช้เอนไซม์ฟูมาเรสที่สามารถเปลี่ยนกรดฟูมาริคเป็นกรดมาลิคได้ โดยทำการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ด้วยเทคนิคการตรึงเซลล์และนิยมผลิตกรดมาลิคจากจุลินทรีย์ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ฟูมาเรสสูงคือ *Brevibucterium ammoniugenes* (Battat และคณะ, 1991) ดังนั้นในปัจจุบันจึงมีความพยายามที่จะผลิตกรดมาลิคด้วยวิธีทางชีวภาพจากการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ แทนการสังเคราะห์กรดมาลิคด้วยวิธีทางเคมี และจากงานวิจัยพบว่าจุลินทรีย์ที่นิยมนำเพาะเลี้ยงคือ เชื้อราจีนัส *Aspergillus* (Abe และคณะ, 1962) แต่การเพาะเลี้ยงเชื้อราจีนัส *Aspergillus* มีการเจริญเติบโตแบบเส้นใยทำให้ส่งผลกระทบต่อการให้อากาศในถังหมัก จำเป็นต้องใช้ถังหมักที่มีใบพัดกวนแบบพิเศษและต้องมีการดูแลรักษาถังหมักมากขึ้น อีกทั้งเชื้อรา *A. flavus* ซึ่งสามารถผลิตกรดมาลิคได้นั้นยังมีการผลิตสารพิษอะฟลาท็อกซินได้ด้วย (Klement และ Büchs,

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2013) ดังนั้นจึงพยายามศึกษาหาแบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดมาลิคได้แทนเชื้อรา ซึ่งมีข้อดีคือมีการเจริญเติบโตที่รวดเร็วและไม่มีการเจริญแบบเส้นใย (David, 2012) ดังนั้นจุลินทรีย์ในกลุ่มแบคทีเรียจึงเหมาะสมที่จะนำมาศึกษาการผลิตกรดมาลิคให้มีประสิทธิภาพสูงยิ่งขึ้น (ประภัสสร และ สุพรรณิกา, 2557)

โดยจากการศึกษาก่อนหน้านี้ได้ทำการศึกษาการคัดแยกจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตกรดมาลิคได้จากธรรมชาติ (ประภัสสร และ สุพรรณิกา, 2557) จากนั้นได้มีการศึกษาการจัดจำแนกจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ และศึกษาปริมาณกลูโคสเริ่มต้นและปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนต ที่มีผลต่อการผลิตกรดมาลิค (พาณิภัค และคณะ, 2558) ดังนั้นโครงงานพิเศษนี้จึงสนใจที่จะศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตกรดมาลิคจากแบคทีเรียที่คัดแยกได้เพิ่มเติม โดยศึกษาผลของชนิดอาหาร อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C:N ratio) และชนิดของแหล่งคาร์บอนที่มีผลต่อการผลิตกรดมาลิค

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

1. เพื่อศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดมาลิค
2. เพื่อศึกษาอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดมาลิค
3. เพื่อศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดมาลิค

1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ

1. ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียที่ศึกษา ได้แก่ ไอโซเลต AG2 และ NEW1 (ประภัสสร และ สุพรรณิกา, 2557)

2. ทำการนำแบคทีเรียที่คัดเลือกได้แก่ ไอโซเลต AG2 และ NEW1 (ประภัสสร และ สุพรรณิกา, 2557) นำมาเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้นและเพาะเลี้ยงในอาหารทั้ง 5 สูตร ได้แก่ shaker medium (Tabushi และคณะ, 1981) main culture (Ochsenreither และคณะ, 2014) calcium malate production (Khan และคณะ, 2014) production medium (Zhang และคณะ, 2011a) และ basic medium (Li และคณะ, 2014)

3. ศึกษาผลของอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน

4. ศึกษาผลของชนิดแหล่งคาร์บอน ได้แก่ กลูโคส ไซโลส กากน้ำตาลไม่ปรับสภาพ กากน้ำตาลปรับสภาพ ซูโครส และกลีเซอรอล

5. วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ด้วยวิธี Dinitrosalicylic colorimetric method (DNS) (Miller, 1959)

6. วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ด้วยวิธี Phenol Sulfuric (Dubois และคณะ, 1956)

7. วัดพีเอชด้วย pH Meter

8. ตกตะกอนแคลเซียมมาเลตด้วยเมทานอล (Wang และคณะ, 2013)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

9. วิเคราะห์ปริมาณแคลเซียมมาเลตด้วยวิธีไทรเทรต (FAO, 2006)

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถผลิตกรดมาลิคได้ปริมาณสูงขึ้น
2. เพิ่มมูลค่าให้กับแหล่งคาร์บอนที่ได้มาจากผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร
3. ลดปริมาณการนำเข้ากรดมาลิคจากต่างประเทศ
4. เพื่อเป็นแนวทางในการผลิตกรดมาลิคในอนาคตต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 กรดมาลิค

กรดมาลิคหรือเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า 2-ไฮดรอกซีบิวเทนไดโออิค เป็นกรดอินทรีย์ที่มีคาร์บอน 4 อะตอม มีสูตรทางเคมีคือ $C_4H_6O_5$ ลักษณะทางกายภาพเป็นผงผลึกสีขาว ละลายน้ำได้ดี เป็นสารตัวกลางที่สำคัญในกระบวนการเมทตาบอลิซึมของเซลล์ กรดมาลิคมีโครงสร้าง 2 แบบ คือ แบบดีและแอล (รูปที่ 2.1) โดยแบบแอลจะสามารถพบได้ทั่วไปในธรรมชาติ เช่น ผลไม้ที่มีรสเปรี้ยว ได้แก่ แอปเปิ้ล องุ่น ฝรั่ง รวมถึงพืชต่างๆ (Peleg และคณะ, 1988) กรดมาลิคถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร เครื่องดื่ม ผลิตภัณฑ์ทำความสะอาดเหล็ก สิ่งทอ ยารักษาโรค และพลาสติกย่อยสลายได้ซึ่งกำลังได้รับความนิยมอย่างสูงเนื่องจากเป็นวัสดุชีวภาพทางเลือกที่มีราคาสูง (Goldberg และคณะ, 2006) ทั้งนี้ได้มีการคาดการณ์ปริมาณการใช้กรดมาลิคในอนาคตว่าจะมีการผลิตมากกว่า 200,000 ตันต่อปี (Sauer และคณะ, 2008)

โดยในปัจจุบันกรดมาลิคสังเคราะห์ได้จากกระบวนการทางเคมี และชีวภาพ เช่น ใช้กรดมาเลอิคและฟูมาริคทำปฏิกิริยาไฮเดรชั่น จากนั้นใช้ความร้อนและความดันสูงเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา หรือการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ด้วยเทคนิคการตรึงเซลล์ (Battat และคณะ, 1991) ซึ่งการใช้วิธีทางชีวภาพนั้นจะทำให้ได้ผลผลิตสูงกว่าเมื่อเทียบกับต้นทุนในการผลิต และมีความปลอดภัยมากกว่าวิธีทางเคมี ดังนั้นจึงนิยมใช้วิธีทางชีวภาพในการผลิตกรดมาลิค อีกทั้งยังมีจุลินทรีย์หลากหลายสายพันธุ์ที่นำมาผลิตกรดมาลิคได้ (Magnuson และ Lasure, 2004) จึงทำให้วิธีทางชีวภาพเป็นวิธีการผลิตที่น่าสนใจในปัจจุบันอีกด้วย

รูปที่ 2.1 แสดงโครงสร้างของ D และ L from ของกรดมาลิค

ที่มา : Shi และ Lu (2013)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 การสังเคราะห์กรดมาลิคด้วยกระบวนการทางชีวภาพ (Biosynthesis of malic acid)

2.2.1 การสังเคราะห์กรดมาลิคโดยการตรึงเอนไซม์ฟูมาเรส

การผลิตกรดมาลิคโดยการตรึงเอนไซม์นั้น ทำได้โดยใช้กรดฟูมาริคเป็นสารตั้งต้นและมีเอนไซม์ฟูมาเรสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทำให้เกิดเป็นกรดมาลิคขึ้น โดยเชื้อแบคทีเรียที่นิยมใช้ในการในการผลิตคือ *Brevibacterium ammoniugenes* เนื่องจากมีกิจกรรมของเอนไซม์ที่สูงจึงทำให้อัตราการผลิตสูงขึ้นตามไปด้วย (Presecki และคณะ, 2007)

Presecki และคณะ (2007) ทำการทดลองเลี้ยงเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* ในถังหมักแบบกึ่งกะ โดยควบคุมสภาวะการปั่นกวนที่ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยจะใช้เอนไซม์ฟูมาเรส 50 ยูนิตต่อมิลลิตร โดยได้ทำการทดลองในสองสภาวะคือมีการตรึงเอนไซม์ด้วยโพลีอะคริลาไมด์เจล และไม่ตรึงเอนไซม์ จากการทดลองพบว่าในสภาวะที่ไม่ทำการตรึงเอนไซม์นั้น ให้ปริมาณกรดมาลิคเพียง 50.5 มิลลิกรัมต่อวัน ในขณะที่สภาวะการตรึงเอนไซม์ให้ปริมาณกรดมาลิคเพียง 7.1 มิลลิกรัมต่อวัน ซึ่งให้ปริมาณกรดมาลิคน้อยกว่าสภาวะที่ไม่ทำการตรึงเอนไซม์แต่ทั้งนี้ยังพบว่าการผลิตกรดมาลิคด้วยเอนไซม์ฟูมาเรสนั้นจะทำให้ได้ผลผลิตออกมาอยู่ในรูปสารผสมที่มีกรดฟูมาริคปนมาด้วย ทำให้ต้องมีกระบวนการแยกโดยทำการปรับสภาวะในถังหมักให้อยู่ในช่วงพีเอช 3.0-4.0 เนื่องจากกรดฟูมาริคจะไม่สามารถละลายได้ แต่ในปัจจุบันมีเทคโนโลยีของ liquid membrane ที่สามารถนำมาช่วยแยกสารออกจากกันได้โดยมีประสิทธิภาพสูงถึงร้อยละ 100

จากงานวิจัยของ Yonghong และ Pingkai (2010) ได้ทำการทดลองผลิตกรดมาลิคโดยการใช้เอนไซม์ฟูมาเรสในถังหมักแบบให้อากาศโดยศึกษาเปรียบเทียบระหว่างแบคทีเรีย *Brevibacterium ammoniugenes* MA-2 และ *Brevibacterium flavum* MA-3 โดยตรึงเซลล์แบคทีเรียด้วยคาราจีแนน และใช้กรดฟูมาริคเป็นสารตั้งต้น พบว่าสามารถผลิตกรดมาลิคได้ 210 และ 218 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ อย่างไรก็ตามในระหว่างการผลิตนั้นพบว่าเกิดกรดฟูมาริคขึ้นด้วย ซึ่งทำให้เกิดปรากฏการณ์ของการยับยั้งการผลิตโดยสารผลิตภัณฑ์ (product inhibition) จากนั้นได้ทดลองใช้เชื้อ *Escherichia coli* ในการผลิตและไม่ใช้วิธีการตรึงเซลล์ พบว่าการผลิตกรดมาลิคในสภาวะที่ไม่ตรึงเซลล์นั้นให้ผลผลิตได้มากถึงร้อยละ 99.9 จึงได้นำไปศึกษาเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมและนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่อไป

2.2.2 การสังเคราะห์กรดมาลิคด้วยการตรึงเซลล์

Neufeld และคณะ (1991) ทำการทดลองสังเคราะห์กรดมาลิคโดยการใช้ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ด้วยวิธีการตรึงเซลล์ และใช้กรดฟูมาริคเป็นสารตั้งต้น ซึ่งเชื้อ *S. cerevisiae* นี้สามารถเปลี่ยนกรดฟูมาริคไปเป็นกรดมาลิคได้ในปริมาณ 65 มิลลิโมลต่อกรัมต่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชั่วโมง ในการผลิตนั้นจะทำการตรึงเซลล์ด้วยเม็ดเจลอะกาโรส ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2.4 มิลลิเมตร และตรึงไว้กับเมมเบรน agarose microsphere ขนาด 193 และ 871 ไมโครเมตร จากการทดลองพบว่ากิจกรรมการทำงานของเชื้อต่อการผลิตกรดมาลิคนั้นจะผกผันกับขนาดของเมมเบรน โดยถ้าใช้เมมเบรนขนาดเล็กก็จะทำให้เชื้อสามารถผลิตกรดมาลิคได้เพิ่มมากขึ้น เนื่องจากการแพร่ผ่านของเอนไซม์จะมีอัตราที่เร็วกว่า ส่งผลให้การผลิตกรดได้ดีขึ้นตามไปด้วย และเมมเบรนที่มีขนาดเล็กย่อมแสดงถึงพื้นที่ผิวที่เล็กตามไปด้วย ทำให้เซลล์ได้รับการกระทบกระเทือนจากการปั่นกวนน้อยลง (Coughlan และ Kierstan, 1988)

Stojkovic และ Plazl (2012) ได้ทำการทดลองใช้วิธีการตรึงเซลลล์แบบ whole-cell microreactor โดยการใช้เชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* MZKIK86 ตรึงไว้กับท่อภายใน microreactor ซึ่งภายในท่อมีการไหลผ่านของฟูมาเรตที่เป็นสารตั้งต้นความเข้มข้น 0.1 โมล ให้อัตราการไหลของเอนไซม์ภายในท่อเท่ากับ 20 ไมโครลิตรต่อนาที และควบคุมอุณหภูมิการเพาะเลี้ยงที่ 30 องศาเซลเซียส จากการทดลองสามารถผลิตกรดมาลิคได้ 174 มิลลิโมลต่อวัน โดยเชื้อยีสต์นั้นสามารถผลิตกรดมาลิคได้ 9 วันก่อนที่อัตราการผลิตจะลดลง ซึ่งการใช้ microreactor นั้นมีข้อดีคือมีขนาดเล็ก แต่ผลผลิตที่ได้ไม่มากเพียงพอต่อการนำไปผลิตในระดับอุตสาหกรรม หากต้องการผลผลิตในอัตราที่สูงขึ้นอาจจะต้องเพิ่มขนาดของ microreactor และหาสภาวะที่เหมาะสมต่อไป

Hronska และคณะ (2014) ทดลองใช้แบคทีเรีย *Norcardia* sp. ในการผลิตกรดมาลิคจากกรดฟูมาริคและมีการควบคุมสภาวะการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พีเอช 8.0 และ มีการเติมสารลดแรงตึงผิวคือ ไทรตันเอ็กซ์ 100 (Triton X-100) และทำการตรึงเซลล์กับโพลีอะครีลาไมด์เจล จากการทดลองนี้พบว่าการตรึงเซลล์ร่วมกับการใส่สารลดแรงตึงผิวนั้นช่วยให้มีการผลิตเอนไซม์ฟูมาเรสเพิ่มจาก 2.5 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เป็น 75 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และผลผลิตของกรดมาลิคที่ได้คือ 62 กรัมต่อลิตร

2.2.3 การสังเคราะห์กรดมาลิคด้วยกระบวนการหมักเซลล์อิสระ

Battat และคณะ (1991) ได้ทำการศึกษาการผลิตกรดมาลิคด้วยกระบวนการหมักโดยใช้เชื้อรา *Aspergillus flavus* ATCC 13697 ทำการเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 10 ลิตร ปั่นกวนที่ 300 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 0.5 ปริมาตรโดยปริมาตรต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 192 ชั่วโมง โดยอาหารเหลวที่ใช้ผลิตกรดมาลิคประกอบด้วยกลูโคส 100 กรัมต่อลิตร NH_4Cl 2.0 กรัมต่อลิตร KH_2PO_4 0.15 กรัมต่อลิตร K_2HPO_4 0.15 กรัมต่อลิตร $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1 กรัมต่อลิตร $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.1 กรัมต่อลิตร $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.005 กรัมต่อลิตร NaCl 0.005 กรัมต่อลิตร และ $CaCO_3$ 80 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้ยังได้ทำการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดมาลิคได้แก่ ความเร็วรอบในการปั่นกวน อัตราการให้อากาศ ความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้น และความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการศึกษาผลของความเร็วในการปั่นกวนที่ 300 350 400 และ 450 รอบต่อนาที พบว่าการใช้ความเร็วในการปั่นกวนที่ต่ำ จะทำให้อัตราการผลิตกรดมาลิคลดลง เนื่องจากมีการถ่ายเทออกซิเจนในถังหมักได้น้อย ซึ่งส่งผลต่อลักษณะการเจริญของเชื้อราทำให้เกิดเป็น pellet ทำให้ได้ปริมาณกรดมาลิคต่ำ โดยความเร็วในการปั่นกวนที่เหมาะสมอยู่ที่ 450 รอบต่อนาที ซึ่งให้ร้อยละผลได้เท่ากับ 71.0 และจากการศึกษาผลของความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นที่ 100 120 และ 140 กรัมต่อลิตร พบว่าความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นต่างกันไม่มีผลต่อการผลิตกรดมาลิคอย่างมีนัยสำคัญ

การศึกษาผลของความเข้มข้นของไนโตรเจน คือ แอมโมเนียซัลเฟต ที่ความเข้มข้น 154 271 307 387 435 480 และ 520 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยความเข้มข้นของไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดฟูมาริคของเชื้อ *A. flavus* คือ 271 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งให้ค่าร้อยละผลได้เท่ากับ 98 ซึ่งไนโตรเจนไม่มีผลต่อการกรดมาลิคโดยตรงแต่มีผลต่อการผลิตกรดฟูมาริคและการผลิตมวลเซลล์ (Rhodes และคณะ, 1962)

อย่างไรก็ตามจากงานวิจัยของ Battat และคณะ (1991) พบว่าการใช้ *A. flavus* ในการผลิตกรดมาลิคนั้น จะพบปัญหาในเรื่องของสารพิษอะฟลาท็อกซิน และกระบวนการผลิตซึ่ง *A. flavus* มีการเจริญเติบโตแบบสร้างเส้นใยจึงทำให้ส่งผลต่อการถ่ายเทอากาศในระหว่างการหมัก ทำให้ได้ปริมาณกรดมาลิคต่ำ จึงได้มีการใช้เชื้อรา *A. niger* มาทำการผลิตกรดมาลิค โดยจากงานวิจัยของ West (2011) ทำการผลิตกรดมาลิคจากการใช้ผลพลอยได้จากกระบวนการกลั่นแอลกอฮอล์ (Stillage) ด้วยเชื้อ *A. niger* ATCC 9029 *A. niger* ATCC 9142 และ *A. niger* ATCC 10577 พบว่าสายพันธุ์ที่สามารถผลิตกรดมาลิคได้ดีที่สุดคือ *A. niger* ATCC 9142 ซึ่งผลิตกรดมาลิคได้ปริมาณ 17 กรัมต่อลิตร และให้ค่าผลได้ 0.8 กรัมต่อกรัม

Knuf และคณะ (2013) ศึกษาการผลิตกรดมาลิคจากเชื้อรา *A. oryzae* NRRL3488 โดยใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน สามารถผลิตกรดมาลิคได้ปริมาณ 30.27 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้ Brown และคณะ (2013) ได้ทำการศึกษาการดัดแปลงยีนที่ควบคุมการแสดงออกของเอนไซม์ไพรูเวตคาร์บอซิเรส (pyruvate decarboxylase) เอนไซม์มาเลต ดีไฮโดรจีเนส (malate dehydrogenase) และ ตัวขนส่งกรดไดคาร์บอกซิลิค (C4-dicarboxylic transporter) ซึ่งจากกระบวนการดัดแปลงนั้นพบว่าทำให้เชื้อ *A. oryzae* NRRL3488 สามารถผลิตกรดมาลิคปริมาณเพิ่มขึ้นเป็น 154 กรัมต่อลิตร ในเวลา 164 ชั่วโมง และมีค่าผลได้เท่ากับ 1.38 โมลต่อโมล ซึ่งได้ผลผลิตสูงกว่าเดิมถึงร้อยละ 68 ทั้งนี้จากการกระบวนการดัดแปลงยีน ทำให้ตัวขนส่งกรดไดคาร์บอกซิลิค (C4-dicarboxylic transporter) สามารถใช้แหล่งคาร์บอนผสมที่เป็นไซโลสกลูโคส ในกระบวนการสังเคราะห์กรดมาลิคได้ แต่อย่างไรก็ตามจากกระบวนการผลิตกรดมาลิคทั้งหมดยังพบว่ามีการผลิตกรดซัคซินิคปริมาณ 13 กรัมต่อลิตร กรดฟูมาริค 0.6 กรัมต่อลิตร และกรดซิตริค 6 กรัมต่อลิตรอีกด้วย ซึ่งทำให้กระบวนการทำให้ผลิตภัณฑ์บริสุทธิ์นั้นมีขั้นตอน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่ยุ่งยากและมีต้นทุนสูง แต่ทั้ง *A. niger* และ *A. oryzae* นั้นมีความปลอดภัยในการใช้งานมากกว่า *A. flavus*

ในปัจจุบันจึงได้มีการสนใจที่จะศึกษาการกระบวนการผลิตกรดมาลิคจากแบคทีเรียเนื่องจากมีความปลอดภัยในการใช้งานและไม่มีผลกระทบต่อถังหมัก เนื่องจากแบคทีเรียไม่มีการเจริญแบบเป็นเส้นใย (David, 2012) โดย Mu และ Wen (2013) ทดลองใช้ *Bacillus subtillus* ในการผลิตกรดมาลิค โดยทำการดัดแปลงยีนซึ่งทำการตัดยีนที่ควบคุมการแสดงออกของเอนไซม์แลคเตตดีไฮโดรจีเนส (lactate dehydrogenase) ออกไป ซึ่งให้ปริมาณการผลิตกรดมาลิค 15.65 มิลลิโมล แต่อย่างไรก็ตามปริมาณกรดมาลิคที่ผลิตได้ ยังอยู่ในปริมาณที่น้อยจึงไม่เหมาะต่อการนำไปใช้ในอุตสาหกรรม

Zhang และคณะ (2011b) ศึกษาการผลิตกรดมาลิคจากเชื้อ *Escherichia coli* ซึ่งมีการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการทำงานของเอนไซม์ ฟูมาเรต รีดักเทส (fumarate reductase) ที่ส่งผลต่อกระบวนการผลิตกรดมาลิคให้เพิ่มขึ้นโดยลดการผลิตกรดฟูมาริค จากการทดลองในการใช้สภาวะการเพาะเลี้ยง 2 ระยะคือการให้เซลล์เจริญเติบโตในสภาวะมีอากาศและผลกรดในสภาวะที่ไม่มีอากาศ พบว่าสามารถผลิตกรดมาลิคได้ 34 กรัมต่อลิตร ในเวลา 72 ชั่วโมง นอกจากนี้จากรายงานของ Ye และคณะ (2013) ได้ทำการตัดต่อยีนที่ควบคุมการแสดงออกของมาลิคเอนไซม์ (malic enzyme) จากเชื้อ *Thermococcus kodakarensis* เข้าไปใน *E. coli* พบว่าทำให้สามารถทนอุณหภูมิที่แปรปรวนได้ โดยจะใช้วิถีไกลโคไลซิส ในการสังเคราะห์กรดมาลิค และจากการทดลองพบว่ามีการผลิตกรดมาลิคซึ่งให้ค่าร้อยละผลได้เท่ากับร้อยละ 72 ในเวลาการผลิต 3 ชั่วโมง

2.3 วิถีการผลิตกรดมาลิคด้วยจุลินทรีย์โดยกระบวนการทางชีวภาพ

กรดมาลิคเป็นกรดอินทรีย์ที่จุลินทรีย์สามารถผลิตได้จากกระบวนการทางชีวภาพ ซึ่งมีวิถีการสังเคราะห์แตกต่างกันตามชนิดของจุลินทรีย์ และแหล่งคาร์บอน จุลินทรีย์โดยทั่วไปสามารถสังเคราะห์กรดมาลิคได้โดย วิถีกรดซิตริค (Citric Acid Cycle) วิถีไกลออกซิเลต (Glyoxylate Cycle) และปฏิกิริยาแอนาเพอโรติค (Anaperotic Reaction)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.1 การสังเคราะห์กรดมาลิคโดยวิถีกรดซิตริค (Citric Acid Cycle)

กรดมาลิคเป็นกรดอินทรีย์ที่สามารถผลิตได้จากวิถีกรดซิตริค ซึ่งเป็นกระบวนการสำคัญในการสังเคราะห์สารชีวเคมีของเซลล์ สามารถพบได้ในในจุลินทรีย์เช่น *Escherichia coli* และสิ่งมีชีวิตทุกชนิด มีหน้าที่หลักคือ การสังเคราะห์สารตัวกลางและผลิตพลังงานให้แก่เซลล์ (Vuoristo และคณะ, 2015) โดยเริ่มจากวิถีไกลโคไลซิส นำกลูโคสที่เป็นสารตั้งต้นมาออกซิไดส์โดยใช้อิเล็คตรอนเปลี่ยนเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ 1 โมเลกุลและ NADH 1 โมเลกุล เพื่อใช้ในการหายใจของเซลล์และเมื่อสิ้นสุดวิถีไกลโคไลซิสจะได้สารตัวกลางคือ ไพรูเวต 2 โมเลกุลเข้าสู่วิถีกรดซิตริคต่อไป

ไพรูเวตที่ได้จากวิถีไกลโคไลซิสจะเปลี่ยนเป็นอะซิติลโคเอ (Acetyl-CoA) โดยการใช้เอนไซม์ไพรูเวตดีไฮโดรจีเนส (pyruvate dehydrogenase) ที่บริเวณไซโทซอลของเซลล์ และหลังจากนั้นจะถูกส่งไปยังบริเวณไมโทคอนเดรียของเซลล์เพื่อเข้าสู่วิถีกรดซิตริค (Citric Acid Cycle) ซึ่งมีทั้งหมด 8 ขั้นตอน (รูปที่ 2.2) (Nelson และ Cox, 2012)

ขั้นที่1 อะซิติล โคเอ (Acetyl-CoA) กับ ออกซาโลอะซิเตต (oxaloacetate) และน้ำ 1 โมเลกุล จะถูกเปลี่ยนเป็นซิเตรต (Citrate) และโคเอ 1 โมเลกุล โดยอาศัยเอนไซม์ซิเตรต ซินเทส (citrate-CoA synthase)

ขั้นที่ 2 ซิเตรต (citrate) จะถูกเปลี่ยนเป็นไอโซซิเตรต (isocitrate) และน้ำ 1 โมเลกุล โดยอาศัยเอนไซม์อะโคนิเทส (enzyme aconitase)

ขั้นที่ 3 ไอโซซิเตรต (Isocitrate) จะถูกเปลี่ยนเป็นแอลฟาคีโตกลูตาเลต (α-Ketoglutarate) และคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) โดยอาศัยเอนไซม์ไอโซซิเตรต ดีไฮโดรจีเนส (isocitrate dehydrogenase) และมีการถ่ายทอดอิเล็กตรอนให้ NAD^+ ทำให้เกิด NADH กับ H^+

ขั้นที่ 4 คีโตกลูตาเลต (Ketoglutarate) จะถูกเปลี่ยนเป็นซัลซินิล โคเอ (Succinyl-CoA) คาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) และ NADH โดยอาศัยเอนไซม์ คีโตกลูตาเลต ดีไฮโดรจีเนส (Ketoglutarate dehydrogenase) ร่วมกับ NAD^+ ที่เป็นตัวรับอิเล็กตรอน

ขั้นที่ 5 ซัคซินิล โคเอ (Succinyl-CoA) จะถูกเปลี่ยนเป็นซัคซิเนต (Succinate) โดยอาศัยเอนไซม์ซัคซินิล โคเอ ซินเทส (succinyl-CoA synthetase) ร่วมกับการเติม GDP (ADP) และฟอสเฟต ทำให้เกิดการสร้าง GTP (ATP) และโคเอ

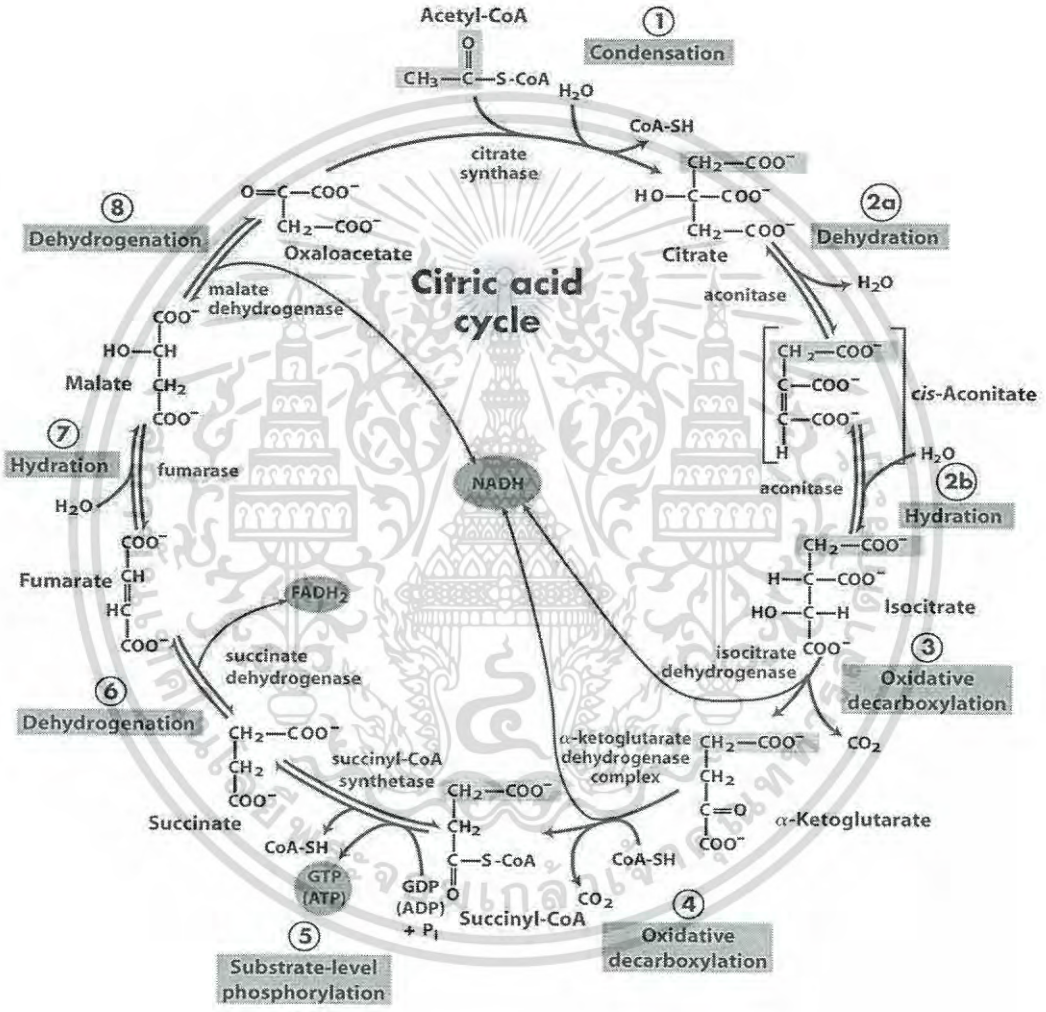
ขั้นที่ 6 ซัคซิเนต (Succinate) จะถูกเปลี่ยนเป็นฟูมาเรต (Fumarate) โดยอาศัยเอนไซม์ฟลาโวโปรตีน ซัคซิเนต ดีไฮโดรจีเนส (flavoprotein succinate dehydrogenase) และยังมีการถ่ายทอดอิเล็กตรอนให้กับ FAD ทำให้เกิด $FADH_2$

ขั้นที่ 7 ฟูมาเรต (Fumarate) จะถูกเปลี่ยนเป็นแอล มาเลต (L-Malate) โดยอาศัยเอนไซม์ฟูมาเรส (fumarase)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และขั้นที่ 8 มาเลต (Malate) จะถูกเปลี่ยนเป็นออกซาโลอะซิเตต (Oxaloacetate) โดยอาศัยเอนไซม์แอล มาเลต ดีไฮโดรจีเนส (L-malate dehydrogenase) และในการเกิดปฏิกิริยามีการถ่ายทอดอิเล็กตรอนให้ NAD^+ ทำให้เกิด NADH กับ H^+

วิถีกรดซิตริคในขั้นที่ 5-8 เป็นปฏิกิริยาที่สามารถผันกลับได้ และจากปฏิกิริยาในวิถีกรดซิตริคข้างต้นสามารถสังเคราะห์กรดมาลิคให้ค่าผลได้สูงสุดตามทฤษฎีเท่ากับ 2 โมลกรดมาลิค ต่อ 1 โมลกลูโคส (Knuf, 2014)

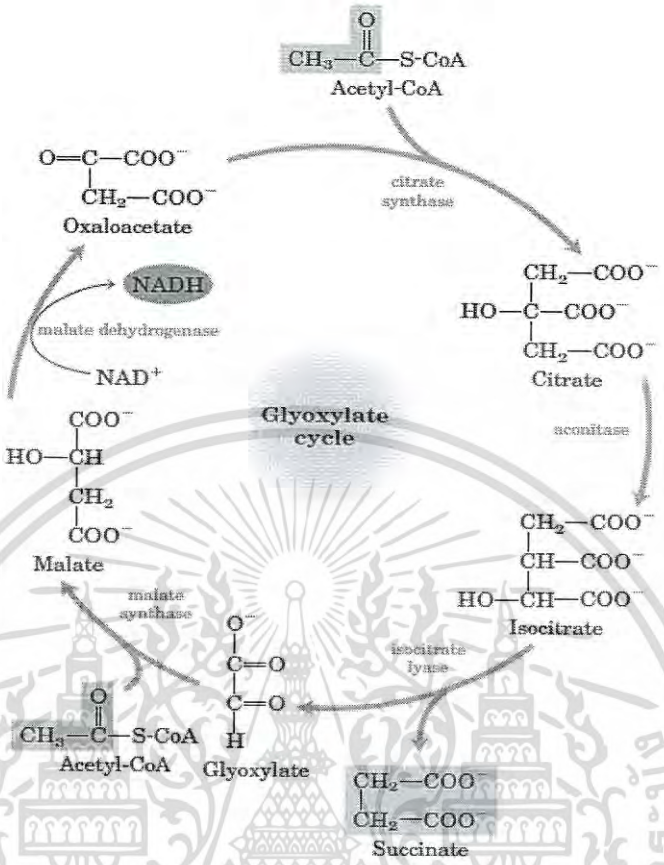


รูปที่ 2.2 แสดงปฏิกิริยาในวิถีกรดซิตริค (Citric Acid Cycle)

ที่มา : Nelson และ Cox (2012)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.2 การสังเคราะห์กรดมาลิคโดยวิถีไกลออกซิเลต (Glyoxylate cycle)



รูปที่ 2.3 แสดงปฏิกิริยาในวิถีไกลออกซิเลต (Glyoxylate cycle)

ที่มา : Nelson และ Cox (2012)

วิถีไกลออกซิเลต (Glyoxylate cycle) (รูปที่ 2.3) สามารถพบได้ในในจุลินทรีย์ เช่น *Escherichia coli* เกิดที่บริเวณไกลออกไซโซม (Glyxoxysome) (Nelson และ Cox, 2012)

โดยเริ่มจากขั้นที่ 1 อะซิติล โคเอ (Acetyl-CoA) และออกซาโลอะซิเตต (oxaloacetate) จะถูกเปลี่ยนไปเป็นซิเตรต (Citrate) โดยอาศัยเอนไซม์ซิเตรต ซินเทส (citrate synthase)

ขั้นที่ 2 ซิเตรต (Citrate) จะถูกเปลี่ยนไปเป็นไอโซซิเตรต (isocitrate) โดยอาศัยเอนไซม์ไอโซซิเตรต ดีไฮโดรจีเนส (isocitrate dehydrogenase)

ขั้นที่ 3 ไอโซซิเตรต (isocitrate) จะถูกเปลี่ยนไปเป็น ซัคซิเนต (succinate) และไกลออกไซเลต (glyoxylate)

ขั้นที่ 4 ไกลออกไซเลต (glyoxylate) และอะซิติล โคเอ (acetyl-CoA) จะถูกเปลี่ยไปเป็นมาเลต (malate) โดยอาศัยเอนไซม์มาเลตซินเทส (malate synthase)

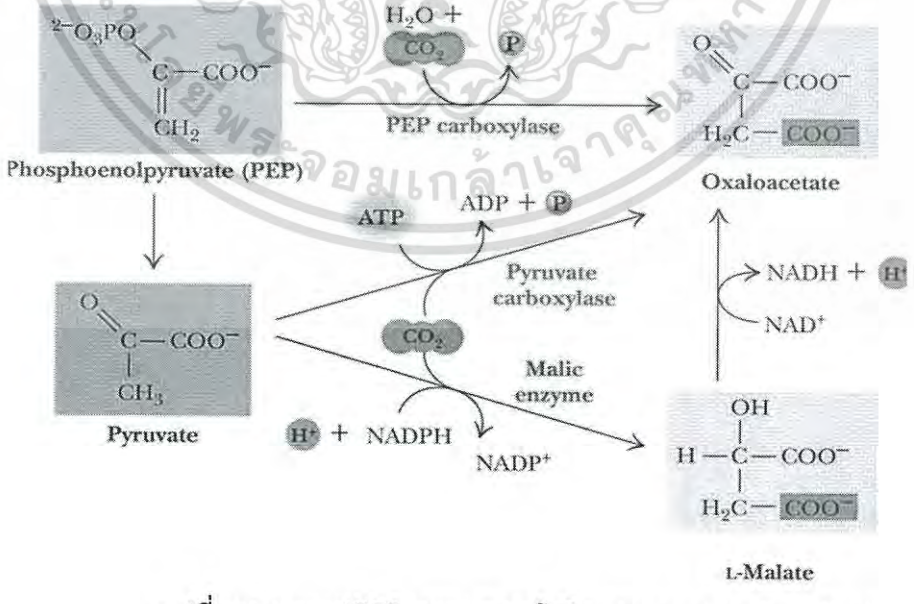
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขั้นที่ 5 มาเลต (malate) จะถูกเปลี่ยนไปเป็นออกซาโลอะซิเตต (oxaloacetate) โดยอาศัยเอนไซม์มาเลตดีไฮโดรจีเนส (malate dehydrogenase) และยังมีการถ่ายทอดอิเล็คตรอนมายังตัวรับอิเล็กตรอน NAD^+ ทำให้เกิด NADH

วิถีไกลออกซิเลต (Glyoxylate cycle) สามารถสังเคราะห์กรดมาลิคโดยให้ค่าผลได้สูงสุดตามทฤษฎีเท่ากับ 1.33 โมลกรดมาลิคต่อ 1 โมลกลูโคส (รูปที่ 2.3) (Knuf, 2014)

2.3.3 การสังเคราะห์กรดมาลิคโดยปฏิกิริยาแอนาเพอโรติค (Anaperotic Reaction)

ปฏิกิริยาแอนาเพอโรติคสามารถเกิดขึ้นได้เมื่อเซลล์เข้าสู่สภาวะที่มีสารตัวกลางคือฟอสโฟอินอลไพรูเวต (phosphoenolpyruvate) เข้าสู่วิถีกรดซิตริคในปริมาณจำกัด สามารถพบได้ในจุลินทรีย์กลุ่มแบคทีเรียและยีสต์ มีการสังเคราะห์ 2 รูปแบบ (Nelson และ Cox, 2012) คือ การสังเคราะห์ออกซาโลอะซิเตต (oxaloacetate) และฟอสเฟต จากฟอสโฟอินอลไพรูเวต (phosphoenolpyruvate) โดยอาศัยเอนไซม์ฟอสโฟอีนอลไพรูเวต คาร์บอกซิเลต (phosphoenolpyruvate carboxylate) ร่วมกับการเติมน้ำและคาร์บอนไดออกไซด์ อย่างละ 1 โมเลกุล นอกจากนั้นยังมีการสังเคราะห์ มาเลต จากไพรูเวต (pyruvate) โดยใช้มาลิคเอนไซม์ (malic enzyme) ร่วมกับการเติม NADPH ปลดปล่อย $NADP^+$ ออกมาอีกด้วย (รูปที่ 2.4) (Michal และ Schomburg, 2012) ซึ่งปฏิกิริยาแอนาเพอโรติค (Anaperotic Reaction) เมื่อเกิดการสังเคราะห์กรดมาลิคจะให้ค่าผลได้สูงสุดตามทฤษฎีเท่ากับ 2 โมลกรดมาลิค ต่อ 1 โมล กลูโคส (Knuf, 2014)



รูปที่ 2.4 แสดงปฏิกิริยาแอนาเพอโรติค (Anaperotic Reaction)

ที่มา : Michal และ Schomburg (2012)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดมาลิค

2.4.1 ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนและองค์ประกอบอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตกรดมาลิค

Taing และ Taing (2007) ทำการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดมาลิคและกรดซัคซินิคของเชื้อ *Zygosaccharomyces rouxii* V19 ซึ่งเป็นยีสต์สายพันธุ์ที่คัดแยกได้จากอาหารหมักที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลสูง โดยทำการศึกษาปัจจัยที่เกี่ยวข้องต่อการผลิตดกรดมาลิค ได้แก่ ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น 10 20 30 40 และ 50 กรัมต่อลิตร ระดับพีเอชในอาหารที่ 4.0 5.0 6.0 7.0 และ 8.0 และอุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อที่ 20 25 30 และ 35 องศาเซลเซียส โดยใช้อาหาร YPG ประกอบไปด้วย yeast extract 0.5 กรัมต่อลิตร peptone กรัมต่อลิตร และกลูโคสตามความเข้มข้นข้างต้น เพาะเลี้ยงในสภาวะเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 140 ชั่วโมง จากผลการทดลองพบว่าการเลี้ยงเชื้อที่ใช้กลูโคสความเข้มข้มที่ 30 กรัมต่อลิตร ที่ระดับพีเอช 5.0 และอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสนั้น ให้ผลการผลิตกรดมาลิคได้ดีที่สุด จึงนำสภาวะดังกล่าวไปศึกษาผลของสารตัวกลางที่ช่วยเร่งการผลิตกรดมาลิค ได้แก่ กรดมาลิค กรดซัคซินิค และกรดกลูตามิค ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.3 และ 0.5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ผลการทดลองพบว่าการเติมกรดกูลตามิคลงไปในอาหารนั้นมีส่วนช่วยให้เกิดการผลิตกรดมาลิคที่มากขึ้น โดยผลิตได้ถึง 74.9 กรัมต่อลิตร

ตารางที่ 2.1 ผลของความเข้มข้นของสารตัวกลางต่อการผลิตกรดมาลิคโดยเชื้อ *Zygosaccharomyces rouxii* V19

อาหารเลี้ยงเชื้อ (ร้อยละโดยน้ำหนักต่อปริมาตร)	กรดมาลิค (กรัมต่อลิตร)	ผลได้ (กรัมต่อกรัม)
Glucose ร้อยละ 10, malic ร้อยละ 0.3	21.5	22.6
Glucose ร้อยละ 10, succinic ร้อยละ 0.3	10.1	10.6
Glucose ร้อยละ 10, glutamic ร้อยละ 0.3	17.8	18.2
Glucose ร้อยละ 30, malic ร้อยละ 0.5	37.1	21.1
Glucose ร้อยละ 30, succinic ร้อยละ 0.5	13.3	7.4
Glucose ร้อยละ 30, glutamic ร้อยละ 0.5	74.9	32.8

ที่มา : Taing และ Taing (2007)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Khan และคณะ (2014) ได้ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตแคลเซียมมาเลตโดยเชื้อรา *Penicillium viticola* 152 ในถังหมักขนาด 10 ลิตร และใช้ความเร็วในการปั่นกวนที่ 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน โดยการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว basic medium ซึ่งประกอบด้วย กลูโคส 140 กรัมต่อลิตร KH_2PO_4 0.1 กรัมต่อลิตร $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1 กรัมต่อลิตร KCl 0.5 กรัมต่อลิตร $CaCO_3$ 40 กรัมต่อลิตร และมี Corn steep liquor (CSL) เป็นส่วนประกอบ ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.25 0.50 0.75 1.00 และ 2.00 โดยปริมาตร

จากผลการทดลองนั้นพบว่าการใช้ Corn steep liquor ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยปริมาตร นั้นสามารถผลิตแคลเซียมมาเลตได้ 168.0 ± 4.5 กรัมต่อลิตร หรืออัตราการผลิตอยู่ที่ 1.75 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ภายในระยะเวลา 96 ชั่วโมง โดย Sharma และคณะ (2013) รายงานว่าข้อดีของการใช้ CSL นั้นคือเป็นสารพลอยได้จากอุตสาหกรรมการผลิตแป้งมัน และมีราคาถูก อีกทั้งยังมีสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ ซึ่ง CSL ประกอบไปด้วย โปรตีน ร้อยละ 40 กรดแลคติคร้อยละ 21 แหล่งไนโตรเจนอิสระร้อยละ 16 วิตามินและแร่ธาตุอื่นๆ ซึ่ง CSL มีไบโอตินเป็นองค์ประกอบ โดยทำหน้าที่เป็นโคเอนไซม์ที่ช่วยในการผลิตเอนไซม์ไพรูเวตคาร์บอกซิเลส (pyruvate carboxylase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สำคัญในการผลิตกรดมาลิคอีกด้วย (Liggett และ Koffler, 1948) และพบว่าการใช้ CSL ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยปริมาตรเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดมาลิค โดยส่งผลต่อการผลิตชีวมวลของเซลล์ให้เพิ่มขึ้น จึงทำให้เซลล์สามารถผลิตกรดมาลิคได้มากขึ้นตามไปด้วย แต่ในกรณีของการใช้ CSL ที่ความเข้มข้นร้อยละ 2.0 โดยปริมาตรนั้น พบว่ามีการผลิตชีวมวลมากแต่การผลิตกรดมาลิคกลับได้น้อยลง อาจเป็นเพราะว่าเซลล์นั้นนำแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนไปใช้ในการผลิตชีวมวลจนไม่มีแหล่งพลังงานเพื่อผลิตกรดอินทรียน

แต่จากการทดลองของ Khan และคณะ (2014) พบว่าสารผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นอยู่ในรูปแคลเซียมมาเลตซึ่งเกิดจากการตกตะกอนของแคลเซียม หลังจากตั้งส่วนใสจากการเลี้ยงเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งน่าจะเกิดจากการที่แคลเซียมคาร์บอเนตนั้นรวมตัวกันกับกรดมาลิคทำให้เกิดเป็นแคลเซียมมาเลตเกิดขึ้นอยู่บนเส้นใยไฮฟาของเชื้อรา ซึ่งรายงานของ Peleg และคณะ (1998) พบว่าจากการผลิตกรดมาลิคด้วยเชื้อรา *Aspergillus flavus* พบการตกตะกอนของผลึกเกลือคือแคลเซียมมาเลตในระหว่างการผลิตกรดมาลิคได้ เมื่อใช้แคลเซียมคาร์บอเนตเป็นสารควบคุมพีเอชในอาหารเลี้ยงเชื้อ

Zou และคณะ (2013) ได้ทดลองผลิตกรดมาลิคจากเชื้อ *Aureobasidium pullulans* ZX-10 ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยใช้อาหารเหลว 50 มิลลิลิตรที่ประกอบไปด้วย กลูโคส 60 กรัมต่อลิตร NH_4NO_3 2 กรัมต่อลิตร KH_2PO_4 0.1 กรัมต่อลิตร $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1 กรัมต่อลิตร KCl 0.5 กรัมต่อลิตร $ZnSO_4$ 0.1 กรัมต่อลิตร และ $CaCO_3$ 30 กรัมต่อลิตร ทำการปรับพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อให้ได้ประมาณ 6.0 และทำการเลี้ยงเชื้อในสภาวะเขย่าที่ความเร็ว 220 รอบต่อนาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน ก่อนที่จะนำหัวเชื้อเริ่มต้นไปเลี้ยงในถังหมักเพื่อศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อไป และทำการศึกษาปัจจัยที่เกี่ยวข้องในการผลิตกรดมาลิค ได้แก่ ความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้น โดยใช้ความเข้มข้นที่ 60 90 120 และ 150 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 2.2) และสภาวะการหมักที่แตกต่างกันคือ การหมักแบบกะ การหมักแบบกึ่งกะโดยใช้วิธีการตรึงเซลล์และการหมักแบบกึ่งกะโดยการไม่ตรึงเซลล์ (ตารางที่ 2.3)

ตารางที่ 2.2 ผลความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้นต่อการผลิตกรดมาลิคในฟลาสก์โดยเชื้อ *Aureobasidium pullulans* ZX-10

ความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)	มวลเซลล์ (กรัมต่อลิตร)	กรดมาลิค (กรัมต่อลิตร)	อัตราการผลิต (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)	ผลได้ (กรัมต่อกรัม)
60.00	19.09 ± 0.86	30.77 ± 1.16	0.26 ± 0.01	0.51 ± 0.02
90.00	21.09 ± 0.26	54.90 ± 2.33	0.46 ± 0.02	0.61 ± 0.02
120.00	21.16 ± 1.36	52.48 ± 0.52	0.44 ± 0.01	0.56 ± 0.01
150.00	21.38 ± 0.08	52.39 ± 1.85	0.44 ± 0.02	0.72 ± 0.02

ที่มา : Zou และคณะ (2013)

จากตารางที่ 2.2 พบว่าเมื่อใช้กลูโคสเริ่มต้นที่ความเข้มข้น 150 กรัมต่อลิตร จะให้ผลผลิตของกรดมาลิคที่สูง เนื่องจากกรดมาลิคนั้นใช้วิธีการสังเคราะจากวิถีกรดซิตริค ซึ่งต้องใช้กลูโคสเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์กรดมาลิค เมื่อใช้กลูโคสในปริมาณมากก็จะทำให้ได้ผลของกรดมาลิคมากขึ้นตามไปด้วย แต่ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นที่เหมาะสมกับสภาวะการเลี้ยงเชื้อนั้นๆ เพราะถ้าหากมากเกินไปก็อาจจะทำให้เซลล์ใช้งานได้ไม่หมดและเกิดเป็น Substrate inhibition จากความเข้มข้นของน้ำตาลที่ส่งผลต่อเซลล์ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.3 ผลของการหมักต่อการผลิตกรดมาลิคโดยเชื้อ *Aureobasidium pullulans* ZX-10

ความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)	ชนิดของการหมัก	กรดมาลิค (กรัมต่อลิตร)	อัตราการผลิต (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)
100.00	การหมักแบบกะ	47.3	0.49
	การหมักแบบกึ่งกะ	87.6	0.61
	การหมักแบบกึ่งกะ (มีการตรึงเซลล์)	142.2	0.72

ที่มา : Zou และคณะ (2013)

ตารางที่ 2.3 แสดงการทดลองผลิตกรดมาลิคโดยใช้การหมักที่แตกต่างกันนั้น พบว่าการหมักแบบกึ่งกะที่มีการตรึงเซลล์ไว้ ให้อัตราการผลิตของกรดมาลิคสูงที่สุดคือ 0.72 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ซึ่งการหมักแบบนี้จะมีการตรึงเซลล์ไว้กับตัวกลาง จึงสามารถช่วยลดความเสียหายของเซลล์ไม่ให้ถูกใบพัดปั่นกวนทำลายตัวเซลล์ได้ และช่วยในการเพิ่มปริมาณของเซลล์ได้อย่างรวดเร็วโดยที่เซลล์นั้นผลิตกรดไปพร้อมๆกับการสร้างชีวมวล (Jiang และคณะ, 2010; Suwannakham และ Yang, 1996; Wu และ Yang, 2003)

รายงานของ Zambanini และคณะ (2016) ทำการศึกษาการผลิตกรดมาลิคด้วยเชื้อ *Ustilago trichophora* TZ1 โดยการใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน และศึกษาปัจจัยที่ส่งผลต่อการผลิตกรด ได้แก่ ความเข้มข้นของกลีเซอรอลเริ่มต้น บัฟเฟอร์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ความเข้มข้นของ $FeSO_4$ และ KH_2PO_4 และความเข้มข้นของแคลเซียมคาร์บอเนต ซึ่ง *U. trichophora* สายพันธุ์ต่างๆ ถูกคัดเลือกโดยนำมาเลี้ยงในอาหารแข็งที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนและใช้เมลทิลเรดเป็นอินดิเคเตอร์เพื่อสังเกตการผลิตกรด พบว่าจากทั้งหมด 74 ไอโซเลตนั้น มีเพียง 7 ไอโซเลตที่สามารถผลิตกรดมาลิคได้ จากนั้นทำการเลือกสายพันธุ์ที่มีการผลิตกรดมาลิคได้ดีที่สุดเพื่อมาทำการทดลองต่อไปได้แก่ *Ustilago trichophora* TZ1 ซึ่งสามารถผลิตกรดได้ 2.3 ± 0.1 กรัมต่อลิตร ในเวลา 216 ชั่วโมง

การศึกษาปัจจัยต่างๆที่ส่งผลต่อการผลิตกรดมาลิคนั้นจะใช้อาหาร modified tabuchi medium ที่ประกอบไปด้วย กลีเซอรอล 150 200 250 300 350 และ 450 กรัมต่อลิตร NH_4Cl 0.8 กรัมต่อลิตร MES buffer แคลเซียมคาร์บอเนต ที่ความเข้มข้น 10 50 และ 100 กรัมต่อลิตร $FeSO_4$ และ KH_2PO_4 ที่ความเข้มข้น 0.125 0.25 0.5 และ 1 กรัมต่อลิตร จากนั้นนำไปเลี้ยงในสภาวะเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การศึกษาผลของความเข้มข้นของกลีเซอรอลเริ่มต้นนั้นพบว่าที่ความเข้มข้นมากกว่า 300 กรัมต่อลิตรนั้นทำให้เชื้อไม่สามารถเจริญเติบโตได้ โดยที่ความเข้มข้นของกลีเซอรอลที่เหมาะสมนั้นจะอยู่ที่ 150 กรัมต่อลิตร ซึ่งอัตราการผลิตกรดมาลิคสูงที่สุดคือ 0.50 ± 0.08 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง โดยขณะที่ความเข้มข้นของกลีเซอรอลที่ 200 กรัมต่อลิตร นั้นจะให้ปริมาณกรดมาลิคสูงที่สุดคือ 196 ± 5 กรัมต่อลิตร ทั้งนี้จากการทดลองพบว่าเมื่อความเข้มข้นของกลีเซอรอลเริ่มต้นนั้นจะส่งผลต่อการผลิตชีวมวลของเซลล์ให้สูงขึ้นและทำให้ผลิตกรดมาลิคได้มากขึ้นแต่ในความเป็นจริงนั้นไม่สามารถทำได้ เนื่องจากถ้าใช้ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนมากๆ จะส่งผลต่อเซลล์ทำให้ความเข้มข้นระหว่างภายในและภายนอกเซลล์ไม่เท่ากัน ซึ่งอาจจะทำให้เซลล์ตายได้ (Zambanini และคณะ, 2016)

ผลของชนิดบัฟเฟอร์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยศึกษาเปรียบเทียบระหว่าง MES Buffer และแคลเซียมคาร์บอเนตเป็นสารควบคุมพีเอชของอาหาร จากผลการทดลองพบว่าการใช้แคลเซียมคาร์บอเนตนั้นส่งผลให้ได้ปริมาณกรดมาลิคความเข้มข้น 129 ± 11.0 กรัมต่อลิตร เมื่อเทียบกับการใช้ MES Buffer และไม่ใส่บัฟเฟอร์ปริมาณกรดมาลิคที่ผลิตได้นั้นจะอยู่ที่ 4.01 ± 0.08 กรัมต่อลิตร และ 20 ± 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าระดับพีเอชในอาหารนั้นส่งผลต่อการผลิตกรดด้วย ในอาหารที่มีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตนั้นจะมีพีเอชอยู่ที่ประมาณ 6.0 แต่ในขณะที่ใช้ MES Buffer และในอาหารที่ไม่ใส่บัฟเฟอร์นั้นค่าพีเอชของอาหารจะอยู่ที่ 5.5 และ 4.5 ตามลำดับ ซึ่ง Geiser และคณะ (2014) ได้รายงานว่าในช่วงที่มีพีเอชต่ำๆประมาณ 3.0-4.0 การผลิตกรดของเซลล์นั้นอาจจะทำให้เป็นพิษต่อตัวเซลล์เองได้เช่นกัน ซึ่งส่งผลโดยตรงต่อการผลิตกรด สำหรับผลของความเข้มข้นของ $FeSO_4$ และ KH_2PO_4 นั้นๆ พบว่าที่ความเข้มข้นที่แตกต่างกันไม่ได้มีผลต่อการผลิตกรดมาลิค ซึ่งผลการทดลองที่ได้มีแนวโน้มเช่นเดียวกันกับรายงานของ Jeon และคณะ (2013)

2.4.2 อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C:N ratio)

จากรายงานของ Ding และคณะ (2011) เมื่อทำการผลิตกรดฟูมาริค จากเชื้อรา *Rhizopus oryzae* ในอาหาร seed culture medium เป็นเวลา 36 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที ศึกษาผลของอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน โดยปรับความเข้มข้นของยูเรียเป็น 0.1 0.2 0.4 1.0 และ 2.0 กรัมต่อลิตร และเติมแคลเซียมคาร์บอเนต 50 กรัมต่อลิตร พบว่าเมื่อทำการลดปริมาณของยูเรียซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจนลง ทำให้เชื้อจุลินทรีย์ผลิตกรดฟูมาริค เพิ่มขึ้นจาก 14.4 กรัมต่อลิตร เป็น 40.3 กรัมต่อลิตร และมีการผลิตกรดมาลิค (L-malic) ลดลงจาก 2.1 กรัมต่อลิตร เป็น 0.3 กรัมต่อลิตร ซึ่งอาจเกิดจากกระบวนการ reductive carboxylation pathway ซึ่งมีเอนไซม์ที่สำคัญคือ ฟูมาเรสทำหน้าที่เปลี่ยนมาเลต (L-malate) เป็นฟูมาเรต (fumarate) และการลดลงของปริมาณยูเรียส่งผลให้เอนไซม์ฟูมาเรสทำงานได้มากขึ้นส่งผลให้ปริมาณมาลิคลดลง ในทางตรงข้ามถ้าปริมาณไนโตรเจนสูงจะทำให้เซลล์เจริญเติบโตได้ดีขึ้น แต่จะยับยั้งการสะสมของกรดอินทรีย์ การจำกัดปริมาณของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แหล่งไนโตรเจนจึงเป็นปัจจัยสำคัญสำหรับการทำงานของ fumarase cytosolic และการผลิตกรดของจุลินทรีย์

จากรายงานของ Ochsenreither และคณะ (2014) ซึ่งทำการศึกษาผลของอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน โดยทำการทดลองเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus oryzae* DSM1863 ในอาหารเหลว main culture ในสภาวะเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 353 ชั่วโมง โดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนและ $(NH_4)_2SO_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจน และใช้อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน 100:1 150:1 และ 300:1 โดยปรับความเข้มข้นของ $(NH_4)_2SO_4$ เป็น 2.4 1.6 และ 0.8 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ พบว่าเมื่อทำการเปรียบเทียบอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนสูงสุด (200:1) กับอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่ำสุด (100:1) สามารถผลิตกรดมาลิคได้ในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน คือ 52 และ 55 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ แต่สามารถผลิตกรดฟูมาริคนั้นแตกต่างกันมากคือ 8.44 ± 1.55 และ 0.70 ± 0.07 ตามลำดับ ดังนั้น อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน ที่แตกต่างกันไม่มีผลต่อการผลิตกรดมาลิค แต่มีอิทธิพลต่อการผลิตกรดฟูมาริ ค โดยอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนสูงสุด (200:1) สามารถผลิตกรดฟูมาริคได้มากที่สุด 0.049 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

2.4.3 ชนิดของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตกรดมาลิค

Ochsenreither และคณะ (2014) ศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนต่างๆ ต่อการผลิตกรดมาลิคของเชื้อ *Aspergillus oryzae* DSM1863 โดยทำการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 353 ชั่วโมง โดยใช้แหล่งคาร์บอนต่างๆกัน ได้แก่ กลูโคส 120 กรัมต่อลิตร กลีเซอรอล 109.1 กรัมต่อลิตร หรือไซโลส 111.5 กรัมต่อลิตร ในอาหาร main culture พบว่าเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อโดยใช้กลีเซอรอล หรือ ไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอน ทำให้จุลินทรีย์เริ่มมีการผลิตกรดอินทรีย์ช้า ซึ่งอาจเกิดจากการเปลี่ยนแปลงเมตทาบอลิซึม เพราะแหล่งคาร์บอนในอาหาร pre culture และอาหาร main culture แตกต่างกัน ทำให้ต้องใช้เวลาในการเลี้ยงเชื้อนานถึง 15 วัน เมื่อสิ้นสุดระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงพบว่า แหล่งไนโตเจนมีปริมาณลดลง ในขณะที่แหล่งคาร์บอนกลูโคสและไซโลสมีปริมาณจนเกือบหมด เหลือกลูโคส 9.6 กรัมต่อลิตร ไซโลส 15.8 กรัมต่อลิตร แต่ปริมาณกลีเซอรอลเหลือมากที่สุดถึง 30.6 กรัมต่อลิตร จากการทดลองของ Ochsenreither และคณะ (2014) พบว่ากลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการผลิตกรดมาลิค (58.2 กรัมต่อลิตร) ตามด้วยกลีเซอรอล (45.4 กรัมต่อลิตร) และไซโลส (39.4 กรัมต่อลิตร) แต่ในทางตรงกันข้ามแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสำหรับการผลิตกรดฟูมาริคมากที่สุดคือ กลีเซอรอล (9.3 กรัมต่อลิตร) รองลงมาคือไซโลสและกลูโคสซึ่งให้ความเข้มข้นของกรดฟูมาริคใกล้เคียงกัน

Zou และคณะ (2016) ศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตกรดมาลิคจากเชื้อ *Aureobasidium pullulans* YJ6-11 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบไปด้วย แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ได้แก่ ไซโลส กลูโคส ฟรุกโตส มอลโตส และซูโครส 90 กรัมต่อลิตร NH_4NO_3 2 กรัมต่อลิตร KH_2PO_4 0.1 กรัมต่อลิตร $MgSO_4$ 0.1 กรัมต่อลิตร $ZnSO_4$ 0.1 กรัมต่อลิตร KCl 0.1 กรัมต่อลิตร และแคลเซียมคาร์บอนเนต 30 กรัมต่อลิตร โดยเลี้ยงเชื้อในถังหมักที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส อัตราการปั่นกวนที่ 400-800 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1.3 ปริมาตรต่อปริมาตรต่อเมตร จากการทดลองพบว่าแหล่งคาร์บอนที่สามารถผลิตกรดมาลิคสูงสุด คือ ไซโลส โดยสามารถผลิตกรดมาลิคได้ที่ 91.2 กรัมต่อลิตร ในเวลา 156 ชั่วโมง ซึ่งน้ำตาลไซโลสนั้นสามารถพบได้จากผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรประเภทลิกโนเซลลูโลส จึงได้นำซังข้าวโพดมาทำการปรับสภาพเพื่อเป็นการใช้แหล่งพลังงานทางเลือก ซึ่งการปรับสภาพซังข้าวโพดก่อนนำมาทำการเพาะเลี้ยงเชื้อนั้น ทำได้โดยเติมกรดซัลฟูริคความเข้มข้นร้อยละ 1 และนึ่งด้วยความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 40 นาที จากนั้นทำการเติมเอนไซม์ผสมของไซลาเนสและเซลลูเลส ปริมาณ 10,000 ยูนิตต่อกรัม และนำไปบ่มเพื่อให้เอนไซม์ทำงานที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และนำไปปั่นเหวี่ยงแยกเศษตะกอนออกที่ความเร็วรอบ 4000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที และนำส่วนใสที่ได้ไปใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อต่อไป

การเลี้ยงเชื้อในถังหมักขนาด 5 ลิตรโดยใช้ซังข้าวโพดที่ทำการปรับสภาพแล้วนั้น พบว่าเชื้อ *Aureobasidium pullulans* YJ6-11 สามารถผลิตกรดมาลิคความเข้มข้น 32.4 กรัมต่อลิตร ภายในเวลาการหมัก 72 ชั่วโมง ซึ่งได้น้อยกว่าการใช้น้ำตาลไซโลส เนื่องจากในซังข้าวโพดที่ทำการปรับสภาพแล้วนั้นอาจมีสารพิษในกลุ่ม 5-ไฮโรเมทิลฟูเฟอรัล ฟูเฟอรัล กรดอะซิติค และกรดฟีนอลิค เป็นส่วนประกอบ ดังนั้นจึงอาจส่งผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ (Zou และคณะ, 2015)

Cheng และคณะ (2017) ได้ทำการศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกันต่อกระบวนการเกิดโพลี่มาลิคและได้ทำการย่อยให้ได้เป็นมาลิคจากเชื้อ *Aureobasidium pullulans* โดยใช้แหล่งคาร์บอนทั้งหมด 8 ชนิด ได่แก่ ราฟิโนส ซูโครส ฟรุกโตส กาแลคโตส ไซโลส กากน้ำตาล จากกากถั่วเหลืองที่ไม่ได้ปรับสภาพ และกากน้ำตาลจากกากถั่วเหลืองที่ปรับสภาพแล้ว (ตารางที่ 2.4) โดยการเตรียมหัวเชื้อในอาหารที่ประกอบไปด้วย กลูโคส 60 กรัมต่อลิตร KH_2PO_4 0.1 กรัมต่อลิตร $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1 กรัมต่อลิตร KCl 0.5 กรัมต่อลิตร $ZnSO_4$ 0.1 กรัมต่อลิตร $CaCO_3$ 30 กรัมต่อลิตร Corn steep liquor (CSL) 2.5 กรัมต่อลิตร และปรับพีเอชของอาหารให้ได้ประมาณ 5.5 ก่อนที่จะนำหัวเชื้อมาใช้ในการผลิตกรดในสภาวะเขย่าที่ 220 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4-7 วัน โดยแต่ละสภาวะนั้นจะทำการทดลอง 2 ซ้ำ

ในการย่อยผลิตภัณฑ์ในรูปของโพลีมาลิคให้เป็นมาลิคนั้นทำโดยใช้กรดซัลฟูริคความเข้มข้น 2 โมลาร์ ผสมกับส่วนใสของน้ำเลี้ยงในอัตราส่วน 1:1 จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากการทดลองพบว่าแหล่งคาร์บอนทั้ง 6 ชนิด ที่ใช้ในการศึกษานั้น ให้อัตราการผลิตกรดมาลิคอยู่ในช่วง 0.26-0.46 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง แต่ว่ามีแหล่งคาร์บอนบางชนิดที่ให้อัตราการผลิตช้ากว่าแหล่งคาร์บอนชนิดอื่นๆ ได้แก่ ราฟิโนส และซูโครส ซึ่งใช้เวลาในการผลิตอยู่ที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

144 และ 168 ชั่วโมงตามลำดับ ในขณะที่แหล่งคาร์บอนชนิดอื่นๆ มีอัตราการผลิตกรดอยู่ที่ 120 ชั่วโมง

สำหรับการใช้กากน้ำตาลจากถั่วเหลืองนั้นพบว่าสามารถใช้ในการผลิตกรดได้ดีทั้งในรูปแบบที่ปรับสภาพและไม่ได้ปรับสภาพ ซึ่งกากน้ำตาลจากถั่วเหลืองที่ไม่ได้ปรับสภาพจะใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นที่ 175 และ 300 กรัมต่อลิตร และให้อัตราการผลิตอยู่ที่ 0.24 ± 0.02 และ 0.35 ± 0.08 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ ในขณะที่กากน้ำตาลจากถั่วเหลืองที่ทำการปรับสภาพแล้ว ใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นที่ 80 และ 100 กรัมต่อลิตร ให้อัตราการผลิตอยู่ที่ 0.31 ± 0.04 และ 0.23 ± 0.02 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ แต่เมื่อเทียบค่าผลได้พบว่าการใช้กากน้ำตาลจากถั่วเหลืองที่ไม่ได้ทำการปรับสภาพนั้นมีปริมาณน้อยกว่าถึง 10 กรัมต่อกรัม ซึ่งเกิดจากส่วนประกอบภายในกากน้ำตาลจากถั่วเหลืองนั้นมีตะกอนของโลหะหนักอยู่มาก จึงส่งผลต่อการถ่ายเทของออกซิเจน (Cao และคณะ, 2012) และโลหะหนักนั้นยังเป็นพิษต่อเซลล์ โดยไปยับยั้งการเจริญเติบโตและการทำงานของเอนไซม์ต่างๆที่ส่งผลต่อการผลิตกรดอินทรีย์ได้ แต่กากน้ำตาลจากถั่วเหลืองที่ทำการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริคและแคลเซียมไฮดรอกไซด์นั้น จะช่วยขจัดเศษตะกอนของโลหะหนักได้ (Roukas และคณะ, 1998)

ตารางที่ 2.4 การผลิตกรดมาลิคของเชื้อ *Aureobasidium pullulans* โดยใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน

ชนิดของแหล่งคาร์บอน	ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณกรดมาลิค (กรัมต่อลิตร)	ผลได้ (กรัมต่อกรัม)	อัตราการผลิต (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)
ราฟิโนส	120	37.7 ± 2.5	0.69 ± 0.02	0.26 ± 0.02
ซูโครส	90	54.5 ± 1.6	0.61 ± 0.02	0.32 ± 0.01
กลูโคส	90	54.9 ± 2.3	0.61 ± 0.02	0.46 ± 0.02
ฟรุกโตส	90	43.2 ± 1.2	0.51 ± 0.02	0.36 ± 0.01
กาแลคโตส	90	31.1 ± 0.2	0.56 ± 0.02	0.26 ± 0.01
ไซโลส	90	40.2 ± 9.1	0.57 ± 0.20	0.34 ± 0.02
กากน้ำตาลจากถั่วเหลืองไม่ปรับสภาพ	175	23.3 ± 1.7	0.51 ± 0.07	0.24 ± 0.02
	300	41.5 ± 9.9	0.69 ± 0.08	0.35 ± 0.08
กากน้ำตาลจากถั่วเหลืองปรับสภาพ	80	37.3 ± 4.2	0.45 ± 0.02	0.31 ± 0.04
	100	38.8 ± 4.0	0.40 ± 0.02	0.23 ± 0.02

ที่มา : Cheng และคณะ (2017)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5 การประยุกต์ใช้กรดมาลิค

ในปัจจุบันมีความต้องการใช้กรดมาลิคในระดับอุตสาหกรรมปริมาณมากและอุตสาหกรรมที่ใช้กรดมาลิคในการผลิต เช่น อุตสาหกรรมสารปรุงแต่งอาหาร อุตสาหกรรมเครื่องดื่ม และอุตสาหกรรมยา เป็นต้น

2.5.1 อุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม

ในอุตสาหกรรมอาหารนั้นมีการนำกรดมาลิคมาใช้แทนกรดซิตริค เนื่องจากให้รสชาติที่เปรี้ยวกลมกล่อมมากกว่ากรดซิตริค (Battat และคณะ, 1991) มีการใช้กรดมาลิคเป็นสารเติมแต่งในอาหารกันอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน เช่น แยม ซอสแอปเปิ้ล น้ำมะเขือเทศเข้มข้นและน้ำสับปะรด เป็นต้น (Lumyong และคณะ, 1991)

2.5.2 การใช้เป็นสารคีเลต

สารคีเลตหรือสารช่วยจับไอออนของโลหะหรือซีเควสแทรนท์ (sequestrates) มีบทบาทสำคัญในอาหารคือทำปฏิกิริยากับโลหะและไอออนของโลหะอัลคาไลน์เอิร์ท (alkaline earth metals) ที่ปะปนอยู่ในอาหารเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อน ซึ่งวิธีนี้จะทำให้โลหะหรือไอออนที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาต่างๆ ที่ทำให้อาหารเสื่อมคุณภาพลดน้อยลง ส่งผลให้ช่วยรักษาเสถียรภาพของ สี กลิ่นรส และเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์อาหาร โลหะหลายตัวที่อยู่ในสภาวะคีเลต (chelated state) ในธรรมชาติ เช่น แมกนีเซียมในคลอโรฟิลล์ ทองแดง สังกะสี และแมงกานีสในเอนไซม์หลายชนิด เหล็กในโปรตีนคือ เฟอร์ริทีน (ferritin) และเหล็กในวงพอร์ไพรีนของฮีโมโกลบินของเลือด เมื่อโลหะไอออนเหล่านี้ถูกปลดปล่อยออกมาโดยปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสหรือปฏิกิริยาการแตกหัก (degradation reactions) จะสามารถทำปฏิกิริยาต่างๆ ทำให้เกิดการเปลี่ยนสี เกิดกลิ่นหืน ความขุ่น และการเปลี่ยนแปลงกลิ่นรสของอาหาร สารคีเลตจึงได้ถูกนำมาใช้เพื่อทำให้เกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับโลหะไอออนเหล่านี้และช่วยรักษาคุณภาพของอาหารได้

สารคีเลตที่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารส่วนใหญ่เป็นสารที่ได้จากธรรมชาติ ได้แก่ กรดโพลีคาร์บอกซิลิค (polycarboxylic acid) เช่น กรดซิตริค กรดมาลิค กรดทาร์ทาริค กรดออกซาลิค และกรดซัคซินิค กรดโพลีฟอสฟอริค (polyphospholic) เช่น อะดีโนซีนไตรฟอสเฟต และไพโรฟอสเฟต และโมเลกุลขนาดใหญ่ (macro molecules) เช่น พอร์ไฟรีนและโปรตีน เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.3 อุตสาหกรรมการแพทย์

กรดมาลิคถูกใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตกรดโพลี่มาลิค ซึ่งกรดโพลีมาลิคจะนำไปใช้ในอุตสาหกรรมยาโดยใช้เป็นสารเคลือบตัวยา (Huanga และคณะ, 2012) และกรดมาลิคถูกนำมาใช้ในการรักษาผู้ป่วยโรคตับและผู้ป่วยที่มีอาการ hyperammonemia หรือ โรควงจรยูเรียบกพร่อง (Urea cycle defect) ผู้ป่วยที่เป็นโรคนี้จะมีอาการแอมโมเนียในเลือดสูงส่งผลทำให้เลือดเป็นกรดสูง โดยใช้กรดมาลิคเป็นส่วนประกอบของกรดอะมิโนสำหรับการนำไปฉีดเข้าเส้นเลือดของผู้ป่วย (Peleg และคณะ, 1988)

2.5.4 อุตสาหกรรมการผลิตเครื่องสำอาง

ในปัจจุบันเครื่องสำอางเป็นสิ่งที่ได้รับความนิยมมาก ผู้คนหันมาใช้ผลิตภัณฑ์บำรุงผิวพรรณมากขึ้น เนื่องจากการดำเนินชีวิตประจำวันต้องมีการพบปะผู้คนหรืออยู่กับสังคมที่วุ่นวาย ซึ่งในเครื่องสำอางมีการเติมสารธรรมชาติหรือสารสังเคราะห์หลายชนิดลงไปในเครื่องสำอาง หนึ่งในสารที่นิยมเติมลงไปในเครื่องสำอางคือ สาร AHA (α-hydroxy acid) ซึ่งเป็นสารสกัดจากธรรมชาติที่พบได้ในผลไม้และผักหลายชนิด โดยทั่วไปมักใช้ในเครื่องสำอาง เป็นสารสกัดจากธรรมชาติ (Hsiao และคณะ, 2015) สาร AHA ที่นำมาใช้มีหลายตัว เช่น กรดไกลโคลิค (Glycolic acid) ซึ่งได้มาจากอ้อย กรดแลคติค (Lactic acid) จากนมเปรี้ยว กรดทาร์ทาริค (Tartaric acid) จากมะขาม หรือ ไวน์ที่บ่มนานๆ กรดซิตริค (Citric acid) ได้จากผลไม้จำพวกส้มชนิดต่างๆ และกรดมาลิค (Malic acid) จากแอปเปิ้ล การเติมสาร AHA ลงในเครื่องสำอางเพื่อทำให้ผิวพรรณดูอ่อนนุ่ม ลดรอยเหี่ยวย่น เนื่องจากเชื่อว่ากลไกการออกฤทธิ์ของสาร AHA จะเป็นตัวการสำคัญในการควบคุมสมดุลของความชุ่มชื้นของผิวให้เป็นปกติ นอกจากนี้สาร AHA ยังช่วยกระตุ้นเซลล์ที่ตายแล้วแต่ยังจับกันแน่นให้หลุดออก ช่วยรักษาสิวเสี้ยน เร่งกระบวนการการผลัดเซลล์ผิว และทำให้มีการลอกหลุดของเซลล์ในชั้นหนังกำพร้าอีกด้วย (ธัมม์ทิวัตถ์ นรารัตน์วันชัย, 2555)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

3.1.1 ขวดรูปชมพู่ ขนาด 125 มิลลิลิตร

3.1.2 บีกเกอร์

3.1.3 กระบอกตวง

3.1.4 ปิเปต

3.1.5 ลวดเขี่ยเชื้อ (loop)

3.1.6 ขวดบรรจุอาหาร (Duran)

3.1.7 หลอดทดลอง

3.1.8 ที่วางหลอดทดลอง (Rack)

3.1.9 ตะเกียงแอลกอฮอล์

3.1.10 ลูกยางดูดสาร

3.1.11 ช้อนตักสาร

3.1.12 ขวดไวแอล (Vial)

3.1.13 กระบอกฉีดยาขนาด 3 มิลลิลิตร บริษัท Nipro ประเทศไทย

3.1.14 ตัวกรองที่มีขนาดช่องผ่าน 0.22 ไมครอน

3.1.15 เครื่องวัดความเป็นกรดเบส (pH meter)

3.1.16 เครื่องผสมสารละลาย (Vortex Mixer) บริษัท VELP Scientific ประเทศอิตาลี

3.1.17 เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) ยี่ห้อ HIRAYAMA รุ่น HV-25/50/85/110 ประเทศญี่ปุ่น

3.1.18 เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker) ยี่ห้อ NEW BRUNSWICK รุ่น innova 4230 ประเทศแคนาดา

3.1.19 เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Mettler Toledo รุ่น PG500

3.1.20 โถดูดความชื้น (desiccator)

3.1.21 บิวเรต

3.1.22 ชุดขาตั้งและแคลมป์จับ

3.2 สารเคมี

3.2.1 Glucose ($C_6H_{12}O_6$) ยี่ห้อ Huakang ประเทศจีน

3.2.2 Yeast extract ยี่ห้อ Scharlau Microbiology ประเทศอังกฤษ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.3 Ammonium chloride (NH_4Cl) ยี่ห้อ Univar reagent ประเทศออสเตรเลีย

3.2.4 Potassium sulfate heptahydrate (KH_2PO_4) ยี่ห้อ CARLO ERBA Reagents ประเทศอิตาลี

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

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

3.2.7 Agar ยี่ห้อ Himedia ประเทศอินเดีย

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

3.2.9 Ferous Sulfate Heptahydrate ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$) ยี่ห้อ Fluka Chemika ประเทศสวิสเซอร์แลนด์

3.2.10 Dipotassium hydrogenphosphate trihydrate ($K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$) ยี่ห้อ Univar reagent ประเทศออสเตรเลีย

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

3.2.12 Sodium chloride (NaCl) ยี่ห้อ Univar reagent ประเทศออสเตรเลีย

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

3.2.14 Potassium chloride (KCL) ยี่ห้อ Univar reagent ประเทศออสเตรเลีย

3.2.15 Magnesium sulfate ($MgSO_4$) ยี่ห้อ Fluka Chemika ประเทศสวิสเซอร์แลนด์

3.2.16 Zinc sulfate ($ZnSO_4$) ยี่ห้อ Fluka Chemika ประเทศสวิสเซอร์แลนด์

3.2.17 Corn steep liquor ยี่ห้อ Sigma ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.2.18 Alcohol 70%

3.2.19 Alcohol 95%

3.2.20 Methanol ยี่ห้อ Honey well ประเทศเกาหลี

3.2.21 Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) ยี่ห้อ Univar reagent ประเทศออสเตรเลีย

3.2.22 Hydroxy Naphthol Blue indicator grade ยี่ห้อ Loba chemie ประเทศอินเดีย

3.2.23 Sodium hydroxide (NaOH) ยี่ห้อ Univar reagent ประเทศออสเตรเลีย

3.2.24 Sucrose ยี่ห้อ Univar reagent ประเทศออสเตรเลีย

3.2.25 Glycerol ยี่ห้อ Fisher Chemical ประเทศอังกฤษ

3.2.26 Sulfuric acid (H_2SO_4) ยี่ห้อ Univar reagent ประเทศออสเตรเลีย

3.2.27 Calcium hydroxide ($Ca(OH)_2$) ยี่ห้อ Merck KGaA ประเทศเยอรมัน

3.2.28 Hydrochloric acid (HCl) ยี่ห้อ Loba Chemie ประเทศอินเดีย

3.2.29 กากน้ำตาล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 ขั้นตอนการดำเนินงาน

3.3.1 แบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษา

แบคทีเรียที่ใช้ศึกษามี 2 สายพันธุ์ คือไอโซเลต AG2 และ NEW1 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากแหล่งธรรมชาติ โดย ประภัสสร และ สุพรรณิกา (2557)

3.3.2 การเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรียตั้งต้น

ทำการเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้นโดยการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียไอโซเลต AG2 หรือ NEW1 ที่สามารถผลิตกรดมาลิคได้ในอาหารแข็ง selective medium (ภาคผนวก ก ข้อ 1.1) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-7 วัน จากนั้นถ่ายเชื้อแบคทีเรีย 1-2 ลูป ลงในอาหารเหลว selective medium ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 125 มิลลิลิตร นำไปเลี้ยงในสภาวะเขย่า ที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำหัวเชื้อไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร และปรับให้หัวเชื้อเริ่มต้นมีค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.5 เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

3.3.3 ศึกษาผลของอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดมาลิค

ชนิดของอาหารที่ใช้ในการศึกษาคือ อาหาร shaker culture (ภาคผนวก ก ข้อ 2.1) อาหาร main culture (ภาคผนวก ก ข้อ 2.2) อาหาร calcium malate production (ภาคผนวก ก ข้อ 2.3) อาหาร production medium (ภาคผนวก ก ข้อ 2.4) และอาหาร basic medium (ภาคผนวก ก ข้อ 2.5) โดยที่อาหารทั้ง 5 สูตรใช้กลูโคส 100 กรัมต่อลิตร และแคลเซียมคาร์บอเนต 30 กรัมต่อลิตร ทำการเตรียมอาหารทั้ง 5 สูตร ปริมาตร 30 มิลลิตรลงในฟลาสก์ขนาด 125 มิลลิลิตร จากนั้นนำหัวเชื้อจากข้อ 3.3.2 ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตรเติมในอาหาร และทำการทดลองทั้งหมด 5 ซ้ำ ทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และทำการเก็บตัวอย่างวันที่ 0 1 2 3 4 และ 5 วัน โดยเก็บตัวอย่างปริมาตร 1.5 มิลลิลิตรต่อฟลาสก์ต่อสูตรอาหารต่อวัน และนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จากนั้นนำตัวอย่างน้ำเลี้ยงในแต่ละวันมาปั่นเหวี่ยงที่ 9000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และนำส่วนใสที่ได้ไปวัดน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธีดีเอนเอส วัดพีเอชด้วยเครื่อง pH meter และตกตะกอนแคลเซียมมาเลตด้วยเมทานอลแล้วนำไปวิเคราะห์ปริมาณแคลเซียมมาเลตด้วยวิธีการไทรเทรตต่อไป

3.3.4 ศึกษาผลของอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C:N ratio) ต่อการผลิตกรดมาลิค

จากการศึกษาผลของอาหารพบว่าสูตรอาหารที่ไอโซเลต AG2 สามารถผลิตกรดมาลิคในรูปของแคลเซียมมาเลตได้สูงที่สุด ได้แก่ อาหารสูตร basic medium (ภาคผนวก ก ข้อ 2.5)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และสูตรอาหารที่ไอโซเลต NEW1 สามารถผลิตกรดมาลิคในรูปของแคลเซียมมาเลตได้สูงที่สุด ได้แก่ อาหารสูตร calcium malate production (ภาคผนวก ก ข้อ 2.3) ดังนั้นจึงเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย 2 ชนิดในสูตรอาหารที่กล่าวข้างต้นปริมาตร 30 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ 125 มิลลิลิตร โดยใช้ปริมาณความเข้มข้นของกลูโคส 100 กรัมต่อลิตร และปรับเปลี่ยนปริมาณของแหล่งไนโตรเจนดังนี้ อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนของอาหารสูตร basic medium เท่ากับ 50:1 75:1 100:1 125:1 150:1 และ 200:1 จะใช้แอมโมเนียมซัลเฟต $(NH_4)_2SO_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยใช้ปริมาณ 0.12 0.081 0.06 0.048 0.039 และ 0.03 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (ภาคผนวก ก ข้อ 3.1) อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนของอาหารสูตร calcium malate production เท่ากับ 10:1 20:1 30:1 40:1 50:1 และ 100:1 และมี Corn steep liquor เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยใช้ที่ปริมาตร 13.9 7.2 5.0 3.9 3.2 และ 1.9 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (ภาคผนวก ก ข้อ 3.2) จากนั้นนำหัวเชื้อจากข้อ 3.3.2 ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตรใส่ลงในอาหารแต่ละฟลาสก์ และทำการทดลองทั้งหมด 5 ซ้ำ นำเชื้อไปเพาะเลี้ยงในสภาวะเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และทำการเก็บตัวอย่างวันที่ 0 1 2 3 4 และ 5 วัน โดยเก็บตัวอย่างปริมาตร 1.5 มิลลิลิตรต่อฟลาสก์ต่อสูตรอาหารต่อวันและนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จากนั้นนำตัวอย่างน้ำเลี้ยงในแต่ละวัน มาปั่นเหวี่ยงที่ 9000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และนำส่วนใสที่ได้ไปวัดน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธีดีเอนเอส วัดพีเอชด้วยเครื่อง pH meter และตกตะกอนแคลเซียมมาเลตด้วยเมทานอลแล้วนำไปวิเคราะห์ปริมาณแคลเซียมมาเลตด้วยวิธีการไทรเทรตต่อไป

3.3.5 ศึกษาผลของชนิดของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตกรดมาลิค

จากผลการทดลองในข้อ 3.3.4 ได้ทำการปรับเปลี่ยนชนิดของแหล่งคาร์บอนจากกลูโคสเป็นไซโลส กลีเซอรอล ซูโครส กากน้ำตาลปรับสภาพ และกากน้ำตาลไม่ได้ปรับสภาพ ที่ความเข้มข้นดังนี้ กลูโคสความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร ไซโลสความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร กลีเซอรอลความเข้มข้น 102.22 กรัมต่อลิตร ซูโครสความเข้มข้น 95 กรัมต่อลิตร กากน้ำตาลปรับสภาพ และกากน้ำตาลไม่ปรับสภาพร้อยละ 20 โดยมวลต่อปริมาตร จากนั้นนำหัวเชื้อจากข้อ 3.3.2 ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตรใส่ลงในอาหารแต่ละฟลาสก์ และทำการทดลองทั้งหมด 5 ซ้ำ นำเชื้อไปเลี้ยงในสภาวะเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และทำการเก็บเชื้อโดยแบ่งเป็นวันที่ 0 1 2 3 4 และ 5 วัน โดยเก็บตัวอย่างปริมาตร 1.5 มิลลิลิตรต่อฟลาสก์ต่อสูตรอาหารต่อวัน และนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จากนั้นนำตัวอย่างน้ำเลี้ยงในแต่ละวันมาปั่นเหวี่ยงที่ 9000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และนำส่วนใสที่ได้ไปวัดน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธีดีเอนเอส วัดปริมาณน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธีฟีนอลซัลฟูริค วัดพีเอชด้วยเครื่อง pH meter และตกตะกอนแคลเซียมมาเลตด้วยเมทานอลแล้วนำไปวิเคราะห์ปริมาณแคลเซียมมาเลตด้วยวิธีการไทรเทรตต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.5.1 วิธีการปรับสภาพกากน้ำตาล (Cheng และคณะ, 2017)

นำกากน้ำตาลมาเจือจางด้วยน้ำกลั่น ให้มีความเข้มข้นของน้ำตาลอยู่ที่ประมาณ 100-270 กรัมต่อลิตร และนำมาปรับพีเอชให้ได้ 3.0 ด้วยกรดซัลฟูริค ความเข้มข้น 3 โมลาร์ จากนั้นนำกากน้ำตาลไปทำการต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที และตั้งทิ้งไว้ให้เย็นและนำไปบ่มข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปทำการปั่นเหวี่ยงที่ 7000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 40 นาที เพื่อแยกเศษตะกอนที่ไม่ต้องการออก โดยจะนำส่วนใสที่ได้ไปทำการปรับพีเอชให้อยู่ในช่วง 6.0 ด้วยแคลเซียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 โมลาร์ และนำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ 7000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 40 นาที จากนั้นจะทำการเก็บกากน้ำตาลที่ปรับสภาพแล้วไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้งานต่อไป

3.3.6 ขั้นตอนการวิเคราะห์ปริมาณแคลเซียมมาเลต

3.3.6.1 วิธีการตกตะกอนแคลเซียมมาเลต (Wang และคณะ, 2013)

นำน้ำเลี้ยงปริมาตร 30 มิลลิลิตร ไปทำการปั่นเหวี่ยงที่ 5000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เพื่อแยกเศษตะกอนเซลล์ออก จากนั้นเทส่วนใสลงไปในเมทานอลปริมาตร 15 มิลลิลิตร และทำการปั่นเหวี่ยงที่ 5000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ในขั้นตอนนี้จะเป็นการกำจัดเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ (exopolysaccharides) จากนั้นจะทำการนำส่วนใสที่ได้มาเติมลงไปในเมทานอลปริมาตร 30 มิลลิลิตรและนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน และนำมาปั่นเหวี่ยงที่ 5000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที โดยเทส่วนใสที่เป็นเมทานอลทิ้ง และนำตะกอนที่ได้ไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จะได้ผลึกของแคลเซียมมาเลต

3.3.6.2 การวิเคราะห์ปริมาณแคลเซียมมาเลตด้วยวิธีการไทรเทรต (FAO, 2006)

นำตัวอย่างตะกอนไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และทิ้งไว้ให้เย็นในเดซิเคเตอร์ จากนั้นชั่งตัวอย่างประมาณ 0.2000 กรัม นำมาละลายด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมกรดไฮโดรคลอริคเข้มข้น 0.27 โมลาร์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร และทำการปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากนั้นเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1.08 โมลาร์ ปริมาตร 15 มิลลิลิตร และทำการเติมไฮดรอกซีเนปทอลบูล อินดิเคเตอร์ 2-3 หยด และทำการไทรเทรตกับสารละลาย EDTA ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์

การคำนวณหาปริมาณแคลเซียมมาเลต (FAO, 2006)

1 มิลลิลิตร (0.05 โมลาร์ EDTA) = 8.607 มิลลิกรัม (แคลเซียมมาเลต)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.7 ขั้นตอนการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ซิ่งด้วยวิธี DNS (Miller, 1959)

นำสารละลายตัวอย่างที่ทำการเจือจางแล้วปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร นำไปเติมสารละลาย DNS ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตรและผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร จากนั้นนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที เมื่อครบเวลาแล้วให้นำมาทำให้เย็นทันทีโดยแช่ไว้ในอ่างน้ำเย็น ทำการเติมน้ำกลั่นปริมาตร 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร จากนั้นนำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร โดยใช้กลูโคสเป็นสารละลายมาตรฐาน

3.3.8 ขั้นตอนการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธีฟีนอลซัลฟูริค (Dubois และคณะ, 1956)

นำส่วนใส ปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาเติมฟีนอลความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมกรดซัลฟิวริคเข้มข้น ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงไปอย่างรวดเร็ว ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 10 นาที ในตู้ดูดควัน นำสารละลายที่ได้มาเขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10-20 นาที จากนั้นนำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตร โดยใช้กลูโคสเป็นสารละลายมาตรฐาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

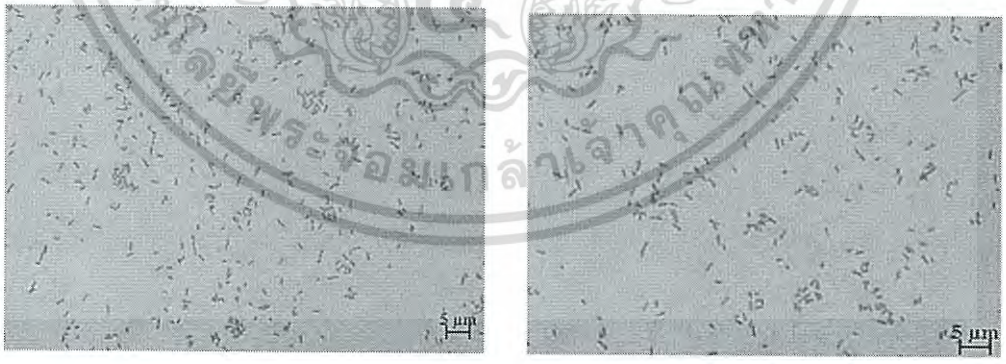
ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

จากงานวิจัยของประภัสสร เทพกัณฑ์ และ สุพรรณิกา ยอดสง่า (2557) ได้ทำการคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดจากแหล่งธรรมชาติ โดยคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดมาลิคได้สูง ได้แก่ ไอโซเลต AG2 และ NEW1 เมื่อนำมาตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยศึกษาลักษณะโคโลนี รูปร่าง และการย้อมแกรม พบว่า

ไอโซเลต AG2 จะมีลักษณะโคโลนีที่กลม แบน สีครีมขุ่น และขอบเรียบ มีรูปร่างเป็นท่อนสั้นอยู่เป็นเซลล์เดี่ยว ไม่มีการสร้างสปอร์ เป็นแกรมลบ (รูปที่ 4.1 A)

ไอโซเลต NEW1 จะมีลักษณะโคโลนีที่กลม แบน สีขาวขุ่น และขอบเรียบ มีรูปร่างเป็นท่อนสั้นอยู่เป็นเซลล์เดี่ยว ไม่มีการสร้างสปอร์ เป็นแกรมลบ (รูปที่ 4.1 B)

จากนั้น พาณิภัค และคณะ (2558) ได้ทำการศึกษาปริมาณกลูโคสที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดมาลิคของไอโซเลต AG2 และ NEW1 โดยทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว shaker medium พบว่าปริมาณกลูโคสที่ความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตกรดมาลิคได้สูงสุด ทางคณะผู้วิจัยจึงสนใจนำแบคทีเรียทั้ง 2 ไอโซเลตนี้มาทำการศึกษาผลของสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน และชนิดของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตกรดมาลิค โดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนเริ่มต้นที่ความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร



AG2 (A) NEW1 (B)

รูปที่ 4.1 แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาของไอโซเลต AG2 (A) และ NEW1 (B) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยายรวม 1000 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1 ผลของสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตกรดมาลิค

ทำการเพาะเลี้ยงไอโซเลต AG2 และ NEW1 ในอาหารเหลว 5 สูตร คือ shaker culture medium, main culture, calcium malate production, production medium และ basic medium ซึ่งอาหารแต่ละสูตรมีชนิดและปริมาณขององค์ประกอบที่แตกต่างกัน โดยใช้กลูโคสเริ่มต้นที่ 100 กรัมต่อลิตร แคลเซียมคาร์บอเนต 30 กรัมต่อลิตร ทำการเพาะเลี้ยงที่สภาวะเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เพื่อแยกตะกอนเซลล์ออก และนำส่วนใสที่ได้ไปตกตะกอน และวิเคราะห์หาปริมาณแคลเซียมมาเลตด้วยวิธีไทรเทรต (Wang, 2013) พร้อมทั้งวัดค่าพีเอช และวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธีดีเอนเอส (DNS method) (Miller, 1959) ผลการทดลองที่ได้แสดงดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 แสดงผลของอาหารเลี้ยงเชื้อ 5 สูตร คือ shaker culture medium, main culture, calcium malate production, production medium และ basic medium ต่อปริมาณแคลเซียมมาเลต ผลได้และอัตราการผลิตของไอโซเลต AG2 และ NEW1 ตามลำดับ

ไอโซเลต	สูตรอาหาร	แคลเซียมมาเลต (กรัมต่อลิตร)	ผลได้ (โมลต่อโมล)	อัตราการผลิต (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)
AG2	shaker culture medium	16.78± 0.06	0.18 ± 0.00	0.14
	main culture	44.88 ± 0.14	0.47 ± 0.00	0.37
	calcium malate production	47.78 ± 0.26	0.53 ± 0.00	0.40
	production medium	39.16 ± 0.50	0.45 ± 0.01	0.33
	basic medium	65.24 ± 0.11	0.71 ± 0.00	0.54
NEW1	shaker culture medium	2.92 ± 0.11	0.03 ± 0.00	0.02
	main culture	49.29 ± 0.16	0.60 ± 0.00	0.41
	calcium malate production	56.62 ± 0.26	0.60 ± 0.00	0.47
	production medium	44.73 ± 0.09	0.60 ± 0.00	0.37
	basic medium	48.62 ± 0.16	0.56 ± 0.00	0.41

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.1 ผลของสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตกรดมาลิคของไอโซเลต AG2

จากตารางที่ 4.1 พบว่า เมื่อทำการเพาะเลี้ยงไอโซเลต AG2 ในอาหารเหลว 5 สูตร คือ shaker culture medium, main culture, calcium malate production, production medium และ basic medium สามารถผลิตแคลเซียมมาเลตได้ 16.78 ± 0.06 44.88 ± 0.14 47.78 ± 0.26 39.16 ± 0.50 และ 65.24 ± 0.11 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งผลได้และอัตราการผลิตสูงที่สุดเท่ากับ 0.71 ± 0.00 โมลต่อโมล และ 0.54 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ เมื่อเพาะเลี้ยงไอโซเลต AG2 ในอาหาร basic medium

เมื่อทำการเพาะเลี้ยงไอโซเลต AG2 เป็นระยะเวลา 5 วัน พบว่าอาหารเหลว shaker culture ปริมาณน้ำตาลลดลงอย่างต่อเนื่องจาก 105.29 ± 0.35 เหลือ 87.52 ± 0.89 50.21 ± 0.25 33.29 ± 0.76 29.07 ± 0.23 และ 7.60 ± 0.17 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (รูปที่ 4.2 A (△)) ส่วนค่าพีเอชเริ่มต้นที่ 7.13 จากนั้นวันที่ 1 ถึงวันที่ 3 พีเอชลดลงเหลือ 6.3 5.9 และ 5.4 ตามลำดับ และวันที่ 4 ถึงวันที่ 5 พีเอชเพิ่มขึ้นเป็น 6.8 และ 6.9 ตามลำดับ ซึ่งมีค่าพีเอชสูงสุดในวันสุดท้ายคือ 6.9 (รูปที่ 4.2 B (△))

อาหารเหลว main culture ปริมาณน้ำตาลลดลงอย่างเห็นได้ชัดในระยะเวลา 3 วัน เริ่มต้นที่ 109.43 ± 0.35 วันที่ 1 ลดลง 22.09 กรัมต่อลิตร เหลือ 87.38 ± 0.24 กรัมต่อลิตร วันที่ 2 และ 3 ลดลงเหลือ 25.05 ± 1.10 และ 11.93 ± 0.18 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่วนในระยะเวลา 2 วันสุดท้ายมีค่าปริมาณน้ำตาลใกล้เคียงกันคือ 9.90 ± 0.46 และ 9.39 ± 0.46 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (รูปที่ 4.2 A (●)) ในขณะที่ค่าพีเอชเริ่มต้น 7 เมื่อผ่านไป 2 วันพบว่าค่าพีเอชลดลงเหลือ 6.1 และ 5.7 ตามลำดับ ในวันที่ 3 ค่าพีเอชเพิ่มขึ้นเท่ากับ 6.8 6.9 และ 7.3 ตามลำดับ ซึ่งมีค่าพีเอชสูงสุดในวันสุดท้ายคือ 7.3 (รูปที่ 4.2 B (●))

อาหารเหลว calcium malate production ปริมาณน้ำตาลลดลงอย่างต่อเนื่องในระยะเวลา 2 วันแรกจากปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น 115.29 ± 0.62 เหลือ 95.76 ± 0.36 และ 28.86 ± 0.21 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ แต่ปริมาณน้ำตาลลดลงเพียงเล็กน้อยในวันที่ 3 เหลือ 28.14 ± 0.25 กรัมต่อลิตร และในวันที่ 4 ปริมาณน้ำตาลลดลง 5 กรัมต่อลิตร เหลือ 23.64 ± 0.51 กรัมต่อลิตร ในวันสุดท้ายเหลือน้ำตาลมากถึง 21.26 ± 0.09 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 4.2 A (▲)) ในขณะที่ค่าพีเอชเริ่มต้น 7.2 และลดลงในระยะเวลา 2 วันแรกเท่ากับ 5.7 5.2 ตามลำดับ จากนั้นในวันที่ 3 ค่าพีเอชเริ่มเพิ่มขึ้นจนกระทั่งค่าพีเอชสูงสุดในวันสุดท้าย 5.4 6.0 และ 6.1 ตามลำดับ (รูปที่ 4.2 B (▲))

อาหารเหลว production medium ปริมาณน้ำตาลลดลงอย่างต่อเนื่องในระยะเวลา 2 วัน จาก 107.62 ± 1.36 กรัมต่อลิตร เหลือ 89.43 ± 0.58 และ 38.60 ± 0.13 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ จากนั้นค่าน้ำตาลในระยะเวลา 3 วันสุดท้ายลดลงเพียงเล็กน้อยคือ 19.19 ± 0.04 18.60 ± 0.38 และ 17.20 ± 0.05 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งปริมาณน้ำตาลวันสุดท้ายคงเหลือในระบบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

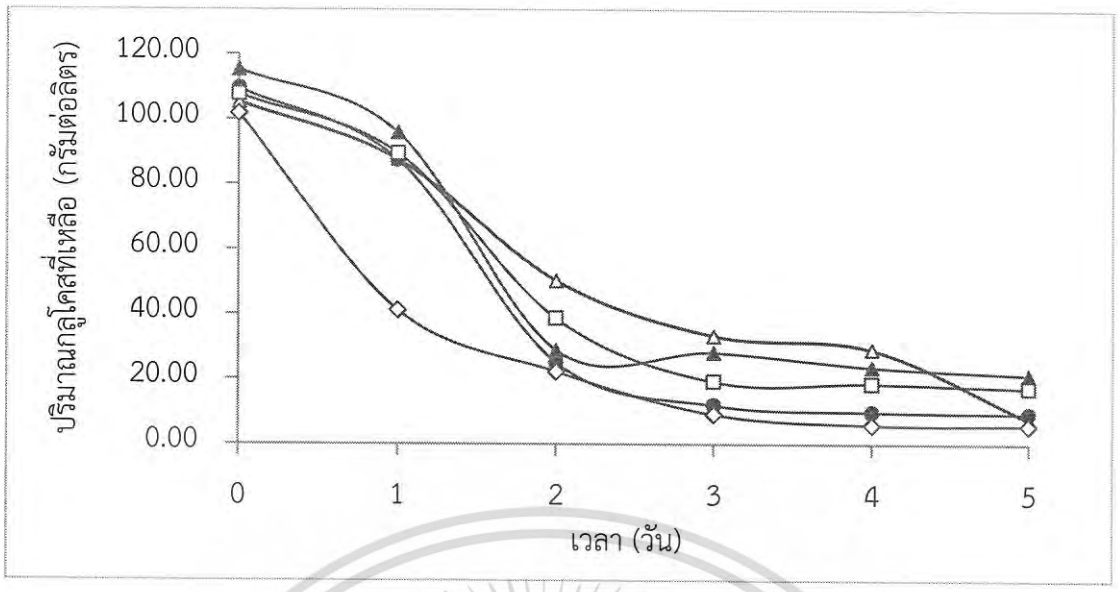
ปริมาณมาก (รูปที่ 4.2 A (□)) ส่วนค่าพีเอชเริ่มต้นที่ 7.3 จากนั้นลดลงในระยะเวลา 2 วันแรกเหลือ 6.4 และ 5.9 เพิ่มขึ้นเป็น 6.0 6.9 และ6.9 ตามลำดับ ซึ่งมีค่าพีเอชลดลงต่ำสุดในวันที่ 1 แต่มีค่าพีเอชสูงที่สุดในวันสุดท้าย (รูปที่ 4.2 B (□))

อาหารเหลว basic medium ปริมาณน้ำตาลลดลงอย่างต่อเนื่องในระยะเวลา 3 วันแรก เริ่มต้นที่ 101.76 ± 0.18 ในวันแรกแล้วลดลง 64.74 กรัมต่อลิตร เหลือ 34.02 ± 0.28 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 2 และ 3 ลดลงเหลือ 29.83 ± 0.15 และ 6.56 ± 0.17 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในระยะเวลา 2 วันสุดท้ายปริมาณน้ำตาลลดลงเพียงเล็กน้อยเท่ากับ 5.89 ± 0.06 และ 5.78 ± 0.07 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (รูปที่ 4.2 A (◇)) ในขณะที่ค่าพีเอชเริ่มต้น 6.3 ลดลงในระยะเวลา 2 วันแรกเท่ากับ 4.6 และ 4.6 ตามลำดับ จากนั้นค่าพีเอชเพิ่มขึ้นจนกระทั่งมีค่าสูงที่สุดในวันสุดท้าย 4.9 5.4 และ 5.8 ตามลำดับ (รูปที่ 4.2 B (◇))

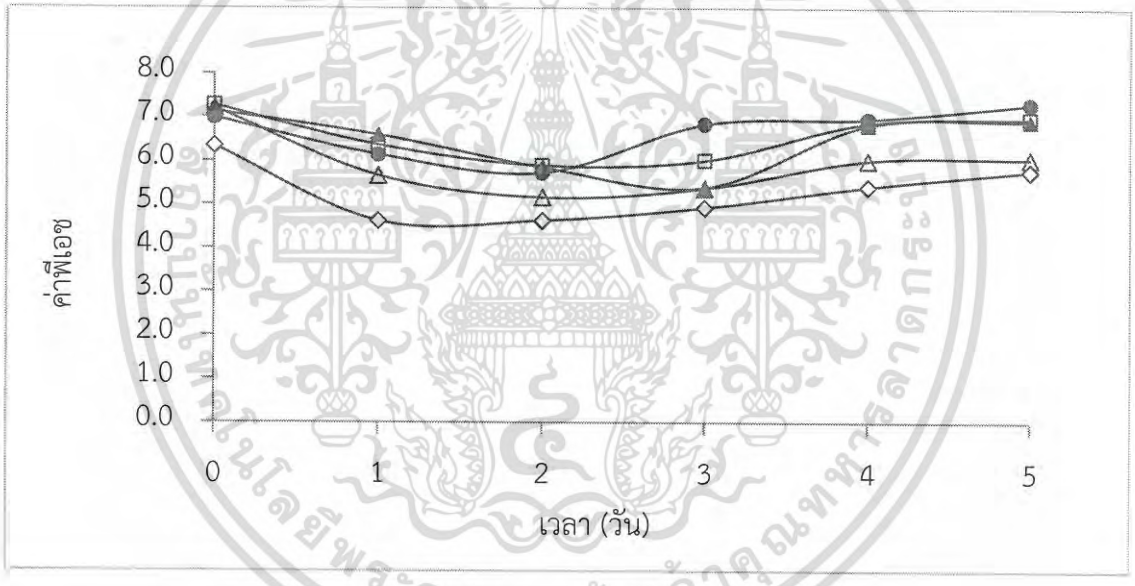
เมื่อเปรียบเทียบอาหารเหลว 5 สูตร คือ shaker culture medium, main culture, calcium malate production, production medium และ basic medium พบว่าสูตรอาหาร calcium malate production มีปริมาณกลูโคสเหลือมากที่สุดคือ 21.26 ± 0.09 กรัมต่อลิตร รองลงมาคืออาหาร production medium, shaker culture medium, main culture, basic medium มีปริมาณกลูโคสเหลือ 17.20 ± 0.05 7.60 ± 0.17 9.39 ± 0.46 และ 5.78 ± 0.07 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (รูปที่ 4.2 A) โดยสูตรอาหาร basic medium ที่มีปริมาณกลูโคสเหลือในระบบน้อยที่สุด ไอโซเลต AG2 สามารถผลิตแคลเซียมมาเลตได้สูงที่สุดถึง 65.24 ± 0.11 กรัมต่อลิตร ในขณะที่ค่าพีเอชทุกสูตรอาหารมีแนวโน้มลดลงในระยะเวลา 2 วัน และเริ่มเพิ่มขึ้นในวันที่ 3 ถึง 4 ส่วนวันสุดท้ายค่าพีเอชมีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย และสูตรอาหารที่มีค่าพีเอชต่ำที่สุดในวันสุดท้ายคือ สูตรอาหาร basic medium เท่ากับ 6.9

เมื่อนำปริมาณแคลเซียมมาเลตที่ได้มาเปรียบเทียบกัน (รูปที่ 4.3) พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงไอโซเลต AG2 ในอาหาร basic medium สามารถผลิตแคลเซียมมาเลตได้สูงที่สุด รองลงมาคืออาหาร calcium malate production, main culture, production medium และ shaker culture medium โดยสามารถผลิตแคลเซียมมาเลตได้เท่ากับ 65.24 ± 0.11 47.78 ± 0.26 44.88 ± 0.14 39.16 ± 0.50 และ 16.89 ± 0.06 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งอาหาร basic medium เป็นอาหารที่ไอโซเลต AG2 สามารถผลิตแคลเซียมมาเลตได้สูงที่สุด สอดคล้องกับค่าผลได้และอัตราการผลิตที่สูงที่สุดเท่ากับ 0.71 ± 0.00 โมลต่อโมล และ 0.54 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



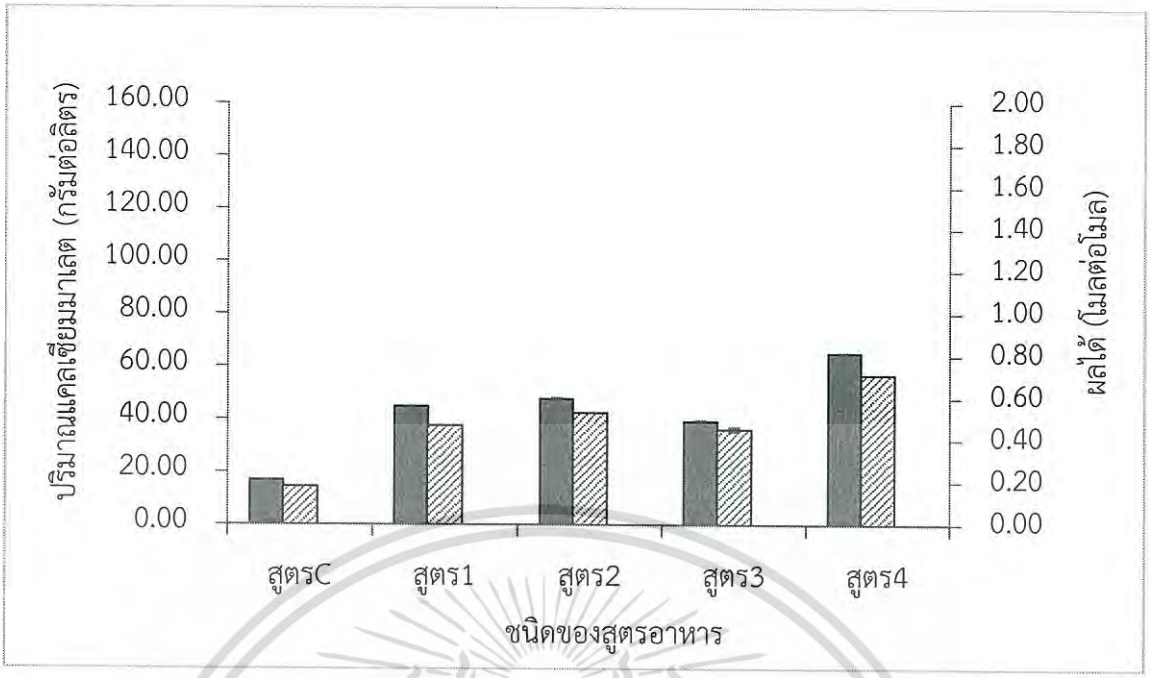
(A)



(B)

รูปที่ 4.2 กราฟแสดงปริมาณกลูโคสที่เหลือ (A) และค่าพีเอช (B) ที่เวลาต่างๆ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงไอโซเลต AG2 ในสูตรอาหาร shaker culture medium (△) main culture (●) calcium malate production (▲) production medium (□) และ basic medium (◇)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.3 กราฟแสดงปริมาณแคลเซียมมาเลต และผลได้ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงไอโซเลต AG2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 5 สูตร คือ shaker culture medium (สูตรC) main culture (สูตร1) calcium malate production (สูตร2) production medium (สูตร3) และ basic medium (สูตร4) เป็นเวลา 5 วัน โดย ■ คือ ปริมาณแคลเซียมมาเลต (กรัมต่อลิตร) และ ▨ คือ ผลได้ (โมลต่อโมล)

4.1.2 ผลของสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตกรดมาลิคของไอโซเลต NEW1

สำหรับไอโซเลต NEW1 เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว 5 สูตร ได้แก่ shaker culture medium, main culture, calcium malate production, production medium และ basic medium จากตารางที่ 4.1 พบว่า สามารถผลิตแคลเซียมมาเลตได้ 2.92 ± 0.11 49.29 ± 0.16 56.62 ± 0.26 44.73 ± 0.09 และ 48.62 ± 0.16 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งผลได้สูงสุดเท่ากับ 0.60 ± 0.00 โมลต่อโมล เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหาร 3 สูตร ได้แก่ main culture, calcium malate production และ production medium ในขณะที่อัตราการผลิตสูงที่สุดเท่ากับ 0.47 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง เมื่อเพาะเลี้ยงไอโซเลต NEW1 ในอาหาร calcium malate production

เมื่อทำการเพาะเลี้ยงไอโซเลต NEW1 เป็นระยะเวลา 5 วัน พบว่า อาหารเหลว shaker culture medium ปริมาณน้ำตาลลดล งอย่างต่อเนื่องในระยะเวลา 5 วัน จากปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น 95.67 ± 3.62 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 1 ลดลงเพียง 8.92 กรัมต่อลิตร เหลือ 86.75 ± 2.11 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 2 ลดลง 26.20 กรัมต่อลิตร เหลือ 60.50 ± 0.47 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 3 ลดลงมากที่สุดคือ 44.65 กรัมต่อลิตร เหลือ 15.85 ± 0.11 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 4.4 A (△)) ในวันที่ 4 และ 5 ปริมาณ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

น้ำตาลลดลงเพียงเล็กน้อยในเท่านั้น เหลือ 8.01 ± 0.11 และ 7.08 ± 0.29 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่วนค่าพีเอชเริ่มต้น 6.9 และลดลงตลอดระยะเวลาที่ทำการเพาะเลี้ยงคือ 5.2 4.3 3.6 3.2 และ 3.2 ตามลำดับ (รูปที่ 4.4 B (△))

อาหารเหลว main culture ปริมาณน้ำตาลลดลงตั้งแต่ 77.88 ± 1.58 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 1 ลดลง 11.05 กรัมต่อลิตร เหลือ 66.83 ± 2.80 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 2 ลดลง 33.95 กรัมต่อลิตร เหลือ 32.88 ± 0.27 กรัมต่อลิตร วันที่ 3 ลดลง 12.80 กรัมต่อลิตร เหลือ 20.08 ± 0.35 ในวันที่ 4 ลดลง 7.01 กรัมต่อลิตร เหลือ 13.07 ± 0.47 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 5 มีปริมาณน้ำตาลใกล้เคียงกับวันที่ 4 คือ 13.60 ± 0.66 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 4.4 A (●)) ในขณะที่พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7.0 ลดลงในระยะเวลา 2 วันแรกคือ 4.9 และ 5.2 ตามลำดับ ในวันที่ 3 ถึงวันที่ 5 ค่าพีเอชเพิ่มขึ้น 5.3 6.8 และ 6.9 ตามลำดับ ซึ่งค่าพีเอชสูงสุดวันสุดท้ายคือ 6.9 (รูปที่ 4.4 B (●))

อาหารเหลว calcium malate production ปริมาณน้ำตาลลดลงอย่างต่อเนื่องในระยะเวลา 4 วัน คือในวันแรกลดลงจาก 122.24 ± 0.41 กรัมต่อลิตร เหลือ 109.10 ± 0.41 ในวันที่ 2 ลดลงมากถึง 78.89 กรัมต่อลิตร เหลือ 30.21 ± 0.94 กรัมต่อลิตร วันที่ 3 ลดลง 21.21 กรัมต่อลิตร เหลือ 9.00 ± 0.11 กรัมต่อลิตร วันที่ 4 ลดลงเพียงเล็กน้อยคือ 6.23 ± 0.08 กรัมต่อลิตร เหลือ 5.90 ± 0.07 กรัมต่อลิตร และมีปริมาณน้ำตาลลดลงเพียงเล็กน้อยในวันที่ 5 เหลือ 5.9 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 4.4 A (▲)) ซึ่งค่าพีเอชเริ่มต้น 7.1 ลดลงในระยะเวลา 3 วันคือ 5.6 6.1 6.3 ตามลำดับ และเพิ่มขึ้นในระยะเวลา 2 วันสุดท้ายคือ 6.4 และ 6.8 ตามลำดับ (รูปที่ 4.4 B (▲))

อาหารเหลว production medium ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น 96.88 ลดลงในระยะเวลา 4 วัน คือ วันที่ 1 ลดลง 39.21 กรัมต่อลิตร เหลือ 57.67 ± 0.97 กรัมต่อลิตร วันที่ 2 ลดลง 35.20 กรัมต่อลิตรเหลือ 22.47 ± 0.94 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 3 ลดลง 4.37 กรัมต่อลิตร เหลือ 18.10 ± 0.29 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 4 ลดลงเพียง 0.55 กรัมต่อลิตร เหลือ 17.55 ± 0.37 กรัมต่อลิตร และในวันสุดท้ายปริมาณน้ำตาลเพิ่มขึ้นเล็กน้อยเหลือ 18.75 ± 0.84 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 4.4 A (□)) ในขณะที่ค่าพีเอชเริ่มต้น 6.1 ลดลงเหลือ 4.8 ในวันแรก และเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องคือ 5.0 6.9 6.8 และ 6.9 ตามลำดับ (รูปที่ 4.4 B (□))

อาหารเหลว basic medium ปริมาณน้ำตาลลดลงอย่างต่อเนื่องในระยะเวลา 5 วัน คือ ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น 83.51 ± 1.55 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 1 ลดลง 12.80 กรัมต่อลิตร เหลือ 70.71 ± 0.68 กรัมต่อลิตร วันที่ 2 ลดลง 38.63 กรัมต่อลิตร เหลือ 32.08 ± 2.86 กรัมต่อลิตร วันที่ 3 ลดลง 12.45 กรัมต่อลิตรเหลือ 19.63 ± 0.22 กรัมต่อลิตร วันที่ 4 และ 5 ลดลงเหลือ 10.04 ± 0.62 และ 6.46 ± 0.28 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งในวันสุดท้ายมีน้ำตาลเหลือระบบเพียงเล็กน้อยเท่านั้น (รูปที่ 4.4 A (◇)) ในขณะที่ค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 4.7 และมีแนวโน้มลดลงตลอด

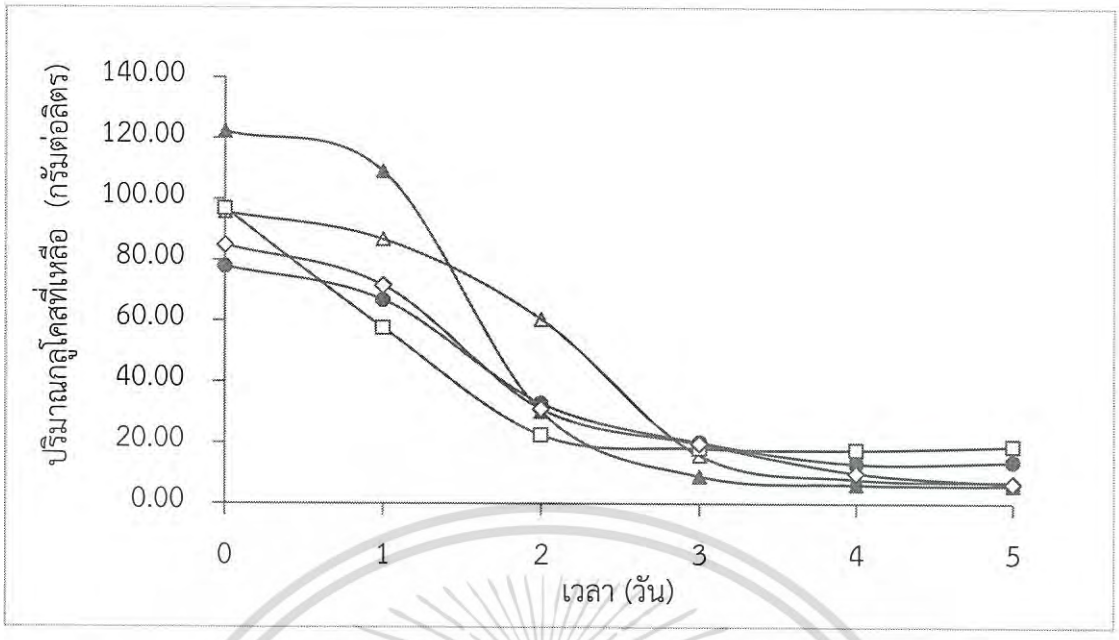
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ระยะเวลาที่ทำการเพาะเลี้ยงคือ 4.1 3.3 3.3 3.2 ในวันสุดท้ายค่าพีเอชลดลงมากที่สุดเหลือ 3.2 ตามลำดับ (รูปที่ 4.4 B (◇))

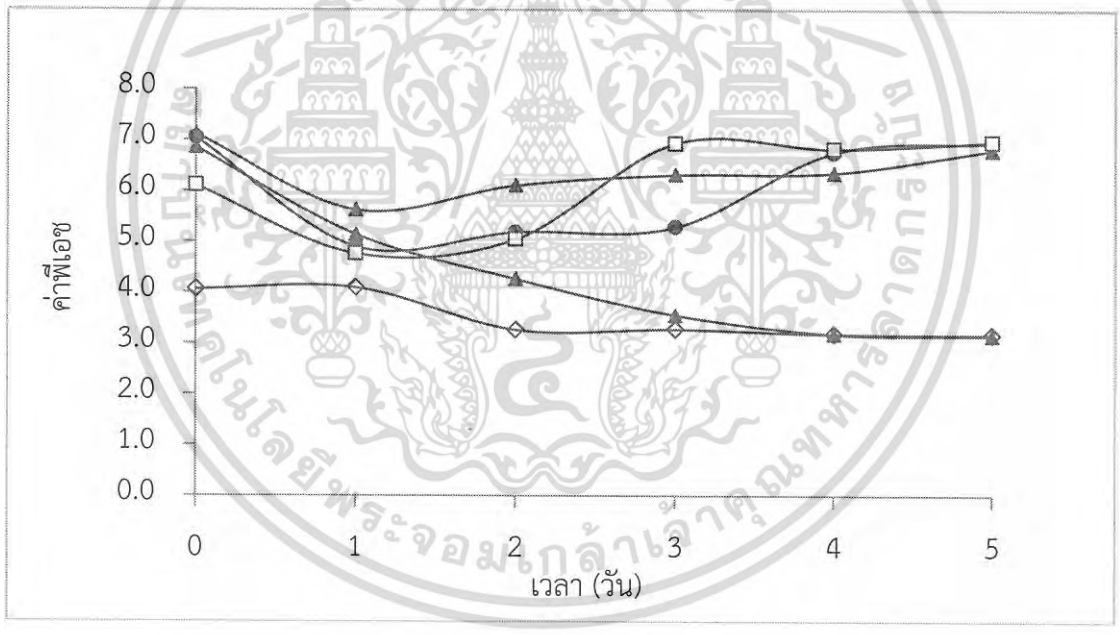
เมื่อเปรียบเทียบอาหารเหลว 5 สูตร คือ shaker culture medium, main culture, calcium malate production, production medium และ basic medium พบว่าสูตรอาหาร production medium มีปริมาณกลูโคสเหลือมากที่สุดคือ 18.75 ± 0.84 กรัมต่อลิตร รองลงมาคืออาหาร main culture, shaker culture medium, basic medium, calcium malate production เหลือกลูโคส 13.60 ± 0.66 7.08 ± 0.29 6.46 ± 0.28 และ 5.90 ± 0.07 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยสูตรอาหาร calcium malate production ที่มีปริมาณกลูโคสเหลือในระบบน้อยที่สุด ไอโซเลต NEW1 สามารถผลิตแคลเซียมมาเลตได้สูงที่สุดถึง 56.63 ± 0.21 กรัมต่อลิตร ในขณะที่ค่าพีเอชของสูตรอาหาร main culture, calcium malate production, production medium ซึ่งมีค่าพีเอชอยู่ในช่วงเบสใกล้เคียงกันเท่ากับ 6.9 6.8 และ 6.9 ตามลำดับ และสูตรอาหาร basic medium, shaker culture medium มีค่าพีเอชอยู่ในช่วงกรดใกล้เคียงกันคือ 3.2 และ 3.2 ตามลำดับ

เมื่อนำปริมาณแคลเซียมมาเลตที่ได้มาเปรียบเทียบกัน (รูปที่ 4.5) พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงไอโซเลต NEW1 ในอาหาร calcium malate production สามารถผลิตแคลเซียมมาเลตได้สูงที่สุด รองลงมาคืออาหาร main culture ซึ่งใกล้เคียงกับ basic medium และลำดับถัดมาคืออาหาร production medium และ shaker culture medium โดยสามารถผลิตแคลเซียมมาเลตได้เท่ากับ 56.62 ± 0.26 49.32 ± 0.16 48.62 ± 0.16 44.37 ± 0.09 และ 2.92 ± 0.11 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งอาหาร calcium malate production เป็นอาหารที่ไอโซเลต NEW1 สามารถผลิตแคลเซียมมาเลตได้สูงที่สุด สอดคล้องกับค่าผลได้และอัตราการผลิตที่สูงที่สุดเท่ากับ 0.60 ± 0.00 โมลต่อโมล และ 0.47 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



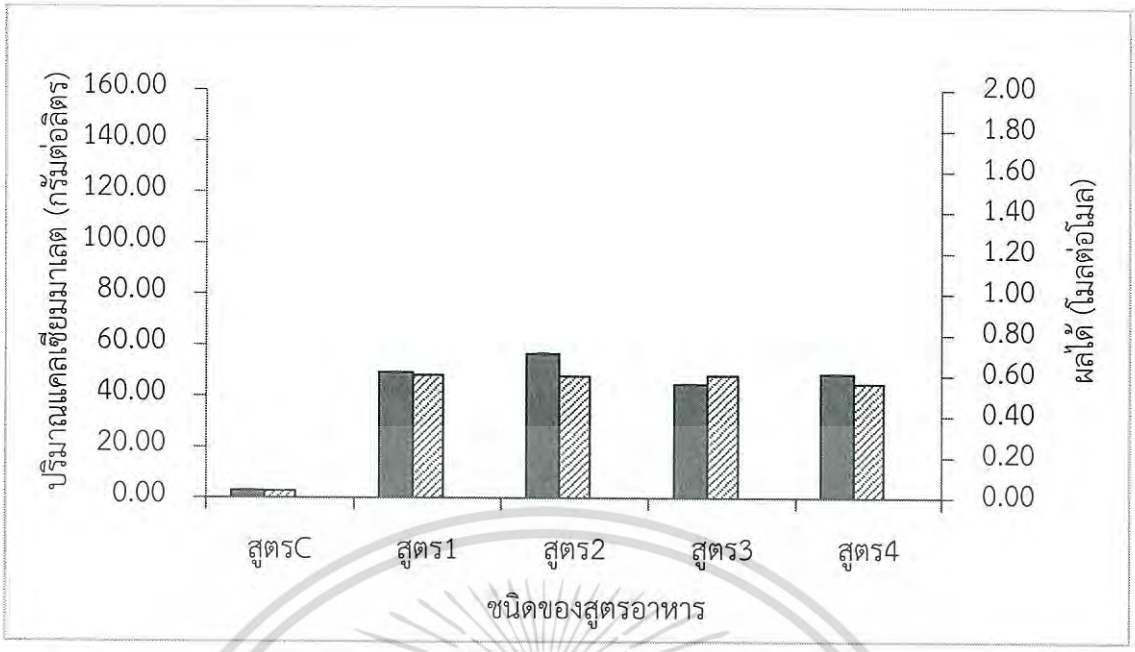
(A)



(B)

รูปที่ 4.4 กราฟแสดงปริมาณกลูโคสที่เหลือ (A) และค่าพีเอช (B) ที่เวลาต่างๆ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงไอโซเลต NEW1 ในสูตรอาหาร shaker culture medium (△) main culture (●) calcium malate production (▲) production medium (□) และ basic medium (◇)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.5 กราฟแสดงปริมาณแคลเซียมมาเลต และผลได้ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงไอโซเลต NEW1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 5 สูตร คือ shaker culture medium (สูตรC) main culture (สูตร1) calcium malate production (สูตร2) production medium (สูตร3) และ basic medium (สูตร4) เป็นเวลา 5 วัน โดย ■ คือ ปริมาณแคลเซียมมาเลต (กรัมต่อลิตร) และ ▨ คือ ผลได้ (โมลต่อโมล)

จากการศึกษาผลของชนิดอาหารต่อการผลิตกรดมาลิคโดยไอโซเลต AG2 และ NEW1 พบว่าในระหว่างการเพาะเลี้ยงแบบเขย่า มีตะกอนสีขาวขุ่นเกิดขึ้น ซึ่งตรงกับรายงานของ Zambanini และคณะ (2016) ที่ศึกษาการเพิ่มปริมาณกรดมาลิค โดยใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนเริ่มต้นและใช้แคลเซียมคาร์บอเนตเป็นสารปรับพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าในระหว่างที่เชื้อมีการผลิตกรดมาลิคนั้น ได้เกิดการฟอร์มตัวของกรดมาลิคในรูปของแคลเซียมมาเลต โดย Khan และคณะ (2014) ได้อธิบายการเกิดแคลเซียมมาเลตไว้ว่า แคลเซียมคาร์บอเนตนั้นจะแยกออกเป็นคาร์บอนไดออกไซด์และแคลเซียม โดยคาร์บอนไดออกไซด์จะถูกส่งเข้าสู่ วิถี reductive TCA ที่บริเวณไซโตซอล (cytosol) ของเซลล์ และเหลือเพียงแคลเซียม (Ca^{2+}) ส่วนเกินที่อยู่ภายนอกเซลล์ซึ่งจะรวมตัวกับกรดมาลิคที่เซลล์ผลิตขึ้น ฟอร์มตัวอยู่ในรูปของแคลเซียมมาเลต โดยที่แคลเซียมมาเลตจะมีพีเอชอยู่ในช่วง 6.0-7.0 (Zambanini และคณะ, 2017) ในขณะที่กรดมาลิคที่ค่าพีเอชจะอยู่ในช่วงประมาณ 3.0-4.0 (Battat และคณะ, 1991) ดังนั้นในการทดลองนี้จึงได้ทำการวิเคราะห์หาปริมาณกรดมาลิคในรูปของแคลเซียมมาเลตด้วยวิธีการไทรเทรต (FAO, 2006)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากรูปที่ 4.2 A และ รูปที่ 4.4 A กราฟแสดงปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือพบว่ามีแนวโน้มในช่วงระยะเวลา 2 วันแรก มีปริมาณน้ำตาลลดลงมากที่สุดแสดงถึงการผลิตชีวมวลที่สูงที่สุดด้วย (Ochsenreither และคณะ, 2014) ซึ่งในระยะที่มีการผลิตชีวมวลจะส่งผลให้ค่าพีเอชในช่วงระยะเวลา 2 วันแรกมีแนวโน้มลดลง (Battat และคณะ, 1991) จากนั้นปริมาณน้ำตาลเริ่มลดลงเพียงเล็กน้อย อาจเกิดจากปริมาณไนโตรเจนและสารอาหารอื่นๆในระบบหมด ทำให้น้ำตาลที่เหลือในระบบจะถูกนำใช้ในการผลิตกรดมาลิค (Knuf และคณะ, 2014) แล้วฟอร์มตัวอยู่ในรูปของแคลเซียมมาเลต ส่งผลให้ค่าพีเอชในวันที่ 3 ถึงวันสุดท้ายเพิ่มขึ้น (Zambanini และคณะ, 2016)

จากการทดลองพบว่า ไอโซเลต AG2 สามารถผลิตแคลเซียมมาเลตได้สูงที่สุดเท่ากับ 65.24 ± 0.11 กรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร basic medium (Li และคณะ, 2014) ในขณะที่ไอโซเลต NEW1 สามารถผลิตแคลเซียมมาเลตได้สูงที่สุดเท่ากับ 56.63 ± 0.26 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร calcium malate production (Khan และคณะ, 2014) ซึ่งอาจเกิดจากส่วนประกอบในอาหารที่แตกต่างกันของอาหารแต่ละสูตร จากงานวิจัยของ Zou และคณะ (2015) พบว่า เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Aureobasidium pullulans* ในอาหาร seed culture ที่มีแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน พบว่าแอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุด สำหรับการผลิตกรดมาลิค (36.24 กรัมต่อลิตร) รองลงมาคือ แอมโมเนียมไนเตรต ($(NH_4)NO_3$) โซเดียมไนเตรต ($NaNO_3$) แอมโมเนียมฟอสเฟต ($NH_4H_2PO_4$) สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) และเพปโตน (peptone) ซึ่งสามารถผลิตกรดมาลิคได้ 30.01 27.50 24.55 23.88 และ 22.24 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับอาหาร basic medium ที่มีแหล่งไนโตรเจนเป็น แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) และจากรายงานของ Khan และคณะ (2014) ศึกษาระดับความเข้มข้นของ Corn steep liquor ที่เหมาะสม ในอาหาร calcium malate production โดยทำการเพาะเลี้ยง *Penicillium viticola* 152 พบว่าที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยปริมาตร สามารถกระตุ้นการผลิตแคลเซียมมาเลตได้สูงถึง 132 กรัมต่อลิตร ซึ่ง Corn steep liquor เป็นแหล่งไนโตรเจนที่เป็นผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมการผลิตแป้งข้าวโพดมีราคาถูก และยังมีสารอาหารที่สำคัญต่อการผลิตกรดมาลิค คือ ไบโอติน ซึ่งเป็นโคเอนไซม์ที่สำคัญต่อการสังเคราะห์กรดมาลิคอีกด้วย (Sharma และคณะ, 2013) และจากรายงานที่ผ่านมาเมื่อพิจารณาถึงปริมาณกรดอินทรีย์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ชนิดต่างๆในอาหารที่แตกต่างกัน ได้แก่ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงยีสต์ (Yeast) ในอาหาร shaker medium (สูตรC) มีผลได้ในการผลิตกรดอิทาโคนิคร้อยละ 35 เมื่อทำการเพาะเลี้ยง *Aspergillus oryzae* ในอาหาร main culture (สูตร1) มีผลได้ของกรดอิทาโคนิค 0.58 โมลต่อโมล (Ochsenreither และคณะ, 2014) เมื่อทำการเพาะเลี้ยง *Penicillium viticola* 152 ในอาหาร calcium malate production (สูตร2) (Khan และคณะ, 2014) สามารถผลิตกรดมาลิคได้ 168 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการเพาะเลี้ยง *Aureobasidium pullulans* ในอาหาร production medium (สูตร3) (Zhang และคณะ, 2011a) สามารถผลิตโพลีมาลิคได้ 59.12 กรัมต่อลิตร และเมื่อทำการเพาะเลี้ยง *Rhizopus delemar* HF-121 ในอาหาร basic medium (สูตร4) (Li และคณะ, 2014) สามารถผลิต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กรดมาลิคได้ 121.80 กรัมต่อลิตร โดยพบว่าจุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความสารถในการเจริญเติบโตและผลิตกรดอินทรีย์ในสูตรอาหารที่มีองค์ประกอบแตกต่างกันและสามารถเจริญเติบโตได้ดีในอาหารที่มีองค์ประกอบอย่างง่าย (Liggett และ Koffler, 1948) โดยในการทดลองครั้งนี้อาหารที่สามารถนำมาผลิตกรดมาลิคได้สูงที่สุดสำหรับไอโซเลต AG2 คือ อาหาร basic medium (สูตร4) และสำหรับไอโซเลต NEW1 คืออาหาร calcium malate production (สูตร2) ซึ่งเป็นสูตรอาหารที่ไอโซเลต AG2 และ NEW1 สามารถใช้องค์ประกอบในอาหารในการผลิตกรดมาลิคได้สูงที่สุด

4.2 ผลของอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่อการผลิตกรดมาลิค

จากการทดลองในหัวข้อ 4.1 ศึกษาผลของสูตรอาหารต่อการผลิตแคลเซียมมาเลต พบว่าไอโซเลต AG2 เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหาร basic medium สามารถผลิตแคลเซียมมาเลตได้สูงที่สุด 65.24 ± 0.11 กรัมต่อลิตร และผลได้สูงสุดอยู่ที่ 0.71 ± 0.00 โมลต่อโมล ในขณะที่เมื่อทำการเพาะเลี้ยงไอโซเลต NEW1 ในอาหาร calcium malate production สามารถผลิตแคลเซียมมาเลตได้สูงที่สุด 56.62 ± 0.26 กรัมต่อลิตร และผลได้สูงสุดอยู่ที่ 0.60 ± 0.00 โมลต่อโมล ดังนั้นจึงได้เลือกอาหารทั้งสองสูตรนี้มาทำการศึกษาผลของอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่อการผลิตแคลเซียมมาเลตที่อัตราส่วน 50:1 75:1 100:1 125:1 150:1 200:1 และ 10:1 20:1 30:1 40:1 50:1 100:1 ในการเพาะเลี้ยงไอโซเลต AG2 และ NEW1 ตามลำดับ

ทำการเพาะเลี้ยงไอโซเลต AG2 ในอาหาร basic medium (Li และคณะ, 2014) โดยใช้กลูโคสเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร และทำการเติมแอมโมเนียมซัลเฟต ที่ใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนในปริมาณที่แตกต่างกันตามอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน 50:1 75:1 100:1 125:1 150:1 และ 200:1 ตามลำดับ สำหรับไอโซเลต NEW1 ทำการเพาะเลี้ยงในอาหาร calcium malate production (Khan และคณะ, 2014) โดยใช้กลูโคสเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร และทำการเติม Corn steep liquor ที่ใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนในปริมาตรที่แตกต่างกันตามอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน 10:1 20:1 30:1 40:1 50:1 และ 100:1 ตามลำดับ โดยทำการเพาะเลี้ยงที่สภาวะเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 และ 4 วัน สำหรับการเพาะเลี้ยงไอโซเลต AG2 และ NEW1 ตามลำดับ จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เพื่อแยกตะกอนเซลล์ออก และนำส่วนใสที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณแคลเซียมมาเลต ด้วยการตกตะกอนด้วยเมทานอลและการไทรเทรตหาปริมาณแคลเซียมมาเลต ตามลำดับ พร้อมทั้งวัดค่าพีเอช และวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธีดีเอนเอส (DNS method) (Miller, 1959) ผลการทดลองที่ได้แสดงดังตารางที่ 4.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 แสดงผลของอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่อปริมาณแคลเซียมมาเลต ผลได้และอัตราการผลิตของไอโซเลต AG2 และ NEW1 เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5 และ 4 วัน ตามลำดับ

ไอโซเลต	สูตรอาหาร	อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน	แคลเซียมมาเลต (กรัมต่อลิตร)	ผลได้ (โมลต่อโมล)	อัตราการผลิต (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)
AG2	basic medium	50:1	58.17 ± 0.14	0.81 ± 0.01	0.48
		75:1	49.82 ± 0.20	0.55 ± 0.00	0.42
		100:1	49.17 ± 0.19	0.51 ± 0.00	0.41
		125:1	47.58 ± 0.08	0.48 ± 0.00	0.40
		150:1	49.38 ± 0.22	0.52 ± 0.00	0.41
		200:1	44.69 ± 0.18	0.46 ± 0.00	0.37
NEW1	calcium malate production	10:1	41.45 ± 0.19	0.36 ± 0.00	0.43
		20:1	43.57 ± 0.17	0.47 ± 0.00	0.45
		30:1	48.00 ± 1.06	0.56 ± 0.01	0.50
		40:1	45.23 ± 0.36	0.49 ± 0.00	0.47
		50:1	37.24 ± 1.08	0.71 ± 0.02	0.39
		100:1	138.18 ± 1.54	1.88 ± 0.02	1.44

4.2.1 ผลของอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่อการผลิตแคลเซียมมาเลตของไอโซเลต AG2

จากตารางที่ 4.2 พบว่า เมื่อทำการเพาะเลี้ยงไอโซเลต AG2 ในอาหาร basic medium ที่มีอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน 50:1 75:1 100:1 120:1 150:1 และ 200:1 พบว่าสามารถผลิตแคลเซียมมาเลตได้ 58.17 ± 0.14 49.82 ± 0.20 49.17 ± 0.19 47.58 ± 0.08 49.38 ± 0.22 และ 44.69 ± 0.18 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งผลได้และอัตราการผลิตสูงสุดเท่ากับ 0.81 ± 0.01 โมลต่อโมล และ 0.48 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับเมื่อทำการเพาะเลี้ยงไอโซเลต AG2 ในอาหาร basic medium ที่มีอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 50:1

เมื่อทำการเพาะเลี้ยงไอโซเลต AG2 ในอาหาร basic medium เป็นระยะเวลา 5 วัน ที่อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน 50:1 75:1 100:1 120:1 150:1 และ 200:1 พบว่าที่อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 50:1 มีปริมาณน้ำตาลลดลงอย่างรวดเร็วในระยะเวลา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2 วัน โดยปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น 104.52 กรัมต่อลิตร เมื่อผ่านไป 2 วัน เหลือน้ำตาล 68.76 กรัมต่อลิตร หลังจากนั้นในวันที่ 3 ปริมาณน้ำตาลลดลงเพียง 2.81 กรัมต่อลิตร เหลือ 65.95 กรัมต่อลิตร ซึ่งไม่แตกต่างกับวันที่ 4 คือ 65.14 กรัมต่อลิตร และในวันสุดท้ายมีปริมาณน้ำตาลเหลือมากกว่าร้อยละ 50 ของปริมาณเริ่มต้นคือ 59.24 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 4.6 A (△)) ขณะที่ค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7.11 ในระยะเวลา 5 วันที่ทำการเพาะเลี้ยงค่าพีเอชเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยเท่านั้น คือ 7.3 7.3 7.4 7.4 และ 7.4 ตามลำดับ (รูปที่ 4.6 B (△))

เมื่อทำการเพาะเลี้ยงไอโซลต AG2 ในอาหาร basic medium ที่มีอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 75:1 ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นคือ 109.48 กรัมต่อลิตร วันที่ 1 ลดลง 11.97 กรัมต่อลิตร เหลือ 97.51 กรัมต่อลิตร แต่ในวันที่ 2 ปริมาณน้ำตาลลดลงมากถึง 68.29 กรัมต่อลิตร เหลือ 41.19 กรัมต่อลิตร วันที่ 3 ลง 3.71 กรัมต่อลิตร เหลือ 37.48 กรัมต่อลิตร และในวันที่ 4 ปริมาณน้ำตาลลดลง 22.81 เหลือ 14.67 กรัมต่อลิตร ซึ่งปริมาณน้ำตาลที่เหลือในวันที่ 4 มี ค่าใกล้เคียงกับวันสุดท้ายคือ 14.58 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 4.6 A (●)) ขณะที่ค่าพีเอชตลอดระยะเวลาที่ทำการเพาะเลี้ยงมีค่าใกล้เคียงกันมาก คือ 7.0 7.4 7.4 7.4 7.3 และ 7.3 ตามลำดับ (รูปที่ 4.6 B (●))

เมื่อทำการเพาะเลี้ยงไอโซลต AG2 ในอาหาร basic medium ที่มีอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 100:1 ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น 107.86 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 1 ลดลง 23.19 กรัมต่อลิตร เหลือ 84.67 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 2 ลดลงมากถึง 59.12 กรัมต่อลิตร เหลือ 25.55 กรัมต่อลิตร วันที่ 3 ลดลง 17.66 กรัมต่อลิตร เหลือ 7.89 กรัมต่อลิตร วันที่ 4 และ 5 ปริมาณน้ำตาลลดลงเหลือ 6.70 และ 6.22 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งในระยะเวลา 2 วันสุดท้ายมีปริมาณน้ำตาลแตกต่างกันเพียงเล็กน้อย (รูปที่ 4.6 A (◆)) ขณะที่ค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6.9 และลดลงใน 2 วันแรกคือ 6.8 และ 6.4 ตามลำดับ จากนั้นค่าพีเอชเพิ่มขึ้นจนกระทั่งมีค่ามากที่สุดในวันสุดท้ายคือ 6.5 7.0 และ 7.3 ตามลำดับ (รูปที่ 4.6 B (◆))

เมื่อทำการเพาะเลี้ยงไอโซลต AG2 ในอาหาร basic medium ที่มีอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 125:1 ในวันที่ 1 ปริมาณน้ำตาลลดลงจาก 107.38 กรัมต่อลิตร เหลือ 90.95 กรัมต่อลิตร วันที่ 2 ลดลง 53.97 กรัมต่อลิตร เหลือ 36.98 กรัมต่อลิตร วันที่ 3 ลดลง 23.66 กรัมต่อลิตร เหลือ 13.32 กรัมต่อลิตร วันที่ 4 ลดลง 9.10 กรัมต่อลิตร เหลือ 4.22 กรัมต่อลิตร และในวันสุดท้ายเหลือน้ำตาลในระบบเพียงเล็กน้อยคือ 3.49 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 4.6 A (□)) ขณะที่ค่าพีเอชเริ่มต้น 6.8 และลดลงในวันแรกเท่ากับ 5.9 จากนั้นค่าพีเอชมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นและมีค่ามากที่สุดในวันสุดท้ายคือ 6.2 6.2 6.70 และ 7.1 ตามลำดับ (รูปที่ 4.6 B (□))

เมื่อทำการเพาะเลี้ยงไอโซลต AG2 ในอาหาร basic medium ที่มีอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 150:1 ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น 110.48 กรัมต่อลิตร และลดลงอย่างต่อเนื่องคือ วันที่ 1 ลดลง 60.10 กรัมต่อลิตร เหลือ 50.38 กรัมต่อลิตร วันที่ 2 ลดลง 33.68 กรัมต่อลิตรเหลือ

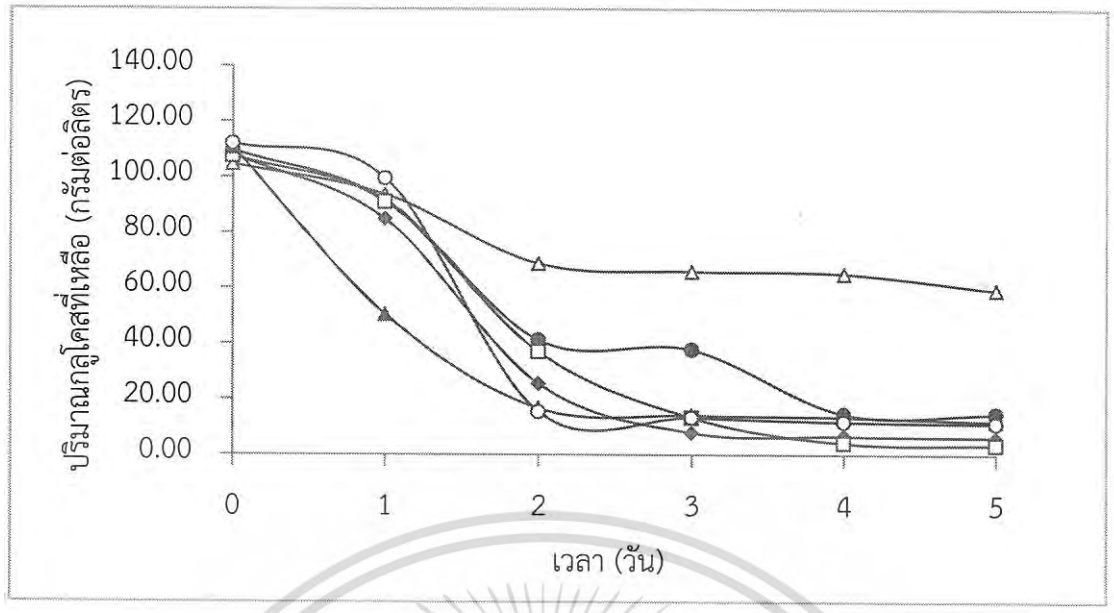
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

16.70 กรัมต่อลิตร วันที่ 3 ลดลงเพียง 2.54 กรัมต่อลิตร เหลือ 14.16 กรัมต่อลิตร วันที่ 4 ลดลงเพียง 0.63 กรัมต่อลิตร เหลือ 13.53 กรัมต่อลิตร และวันที่ 5 เหลือ 11.91 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งในระยะเวลา 3 วันสุดท้ายปริมาณน้ำตาลมีค่าใกล้เคียงกัน (รูปที่ 4.6 A (▲)) ขณะที่ค่าพีเอชเริ่มต้น 6.8 ลดลงเหลือ 5.7 ในวันที่ 1 จากนั้นค่าพีเอชเพิ่มขึ้นจนกระทั่งมีค่าพีเอชสูงสุดในวันสุดท้ายดังนี้ 6.5 6.7 6.8 และ 7.1 ตามลำดับ (รูปที่ 4.6 B (▲))

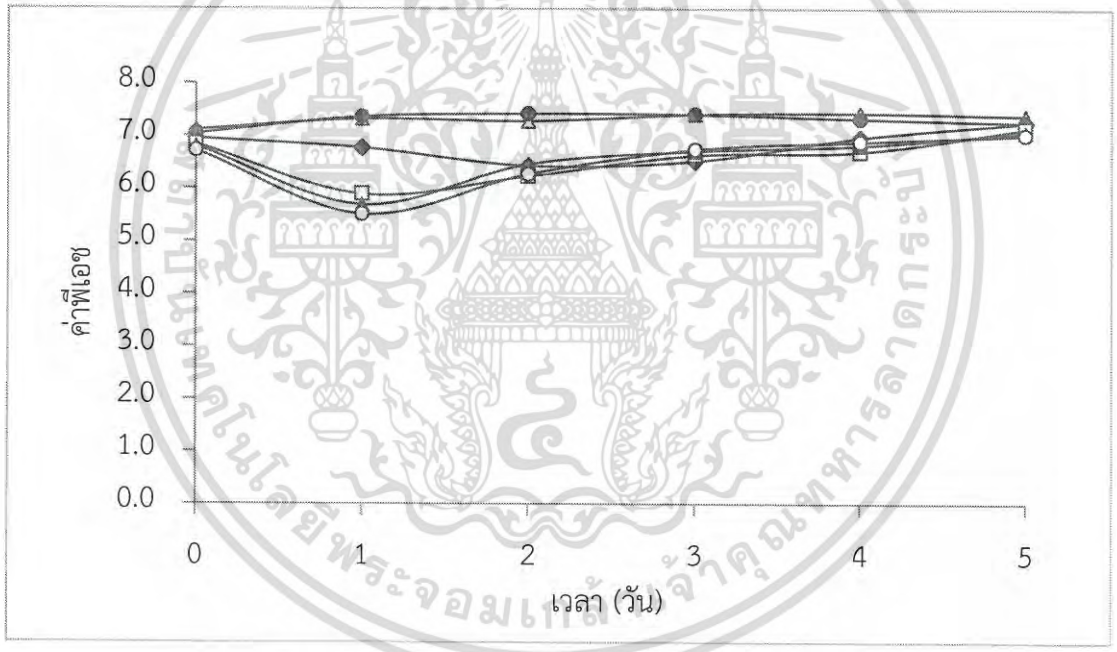
เมื่อทำการเพาะเลี้ยงไอโซลต AG2 ในอาหาร basic medium ที่มีอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 200:1 พบว่าปริมาณน้ำตาลลดลงอย่างต่อเนื่องคือวันที่ 1 ลดลงจาก 111.95 กรัมต่อลิตร เหลือ 99.38 กรัมต่อลิตร วันที่ 2 ลดลงมากถึง 82.95 กรัมต่อลิตร เหลือเพียง 15.43 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 3 ถึง 5 ปริมาณน้ำตาลมีค่าใกล้เคียงกันและลดลงจากวันที่ 2 เพียงเล็กน้อย เหลือ 13.30 11.82 และ 11.23 ตามลำดับ (รูปที่ 4.6 A (○)) ขณะที่ค่าพีเอชเริ่มต้น 6.7 ในวันที่ 1 ลดลงเหลือ 5.5 และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นจนกระทั่งมีค่าสูงที่สุดในวันสุดท้ายคือ 6.3 6.7 6.9 และ 7.2 ตามลำดับ (รูปที่ 4.6 B (○))

เมื่อเปรียบเทียบอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่ 50:1 75:1 100:1 125:1 150:1 และ 200:1 พบว่าที่อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน 50:1 มีปริมาณกลูโคสเหลือมากที่สุดเท่ากับ 59.24 กรัมต่อลิตร รองลงมาคืออัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน 75:1 100:1 120:1 และ 150:1 มีปริมาณกลูโคสเหลือ 14.59 11.91 6.22 และ 3.39 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในขณะที่ค่าพีเอชในวันสุดท้ายของแต่ละอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนมีค่าใกล้เคียงกันประมาณ 7.0 เมื่อนำปริมาณแคลเซียมมาเลตที่ได้มาเปรียบเทียบกัน พบว่าที่อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน 200:1 สามารถผลิตแคลเซียมมาเลตได้ต่ำที่สุดเท่ากับ 44.72 กรัมต่อลิตร และอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน 75:1 100:1 125:1 และ 150:1 สามารถผลิตแคลเซียมมาเลตได้ปริมาณ (รูปที่ 4.7) ใกล้เคียงกันคือ 49.82 ± 0.20 49.17 ± 0.19 44.69 ± 0.18 และ 47.58 ± 0.08 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในขณะที่อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน 50:1 สามารถผลิตแคลเซียมมาเลตได้ปริมาณสูงที่สุดคือ 58.17 ± 0.14 กรัมต่อลิตร ซึ่งสอดคล้องกับค่าผลได้และอัตราการผลิตที่สูงที่สุดเท่ากับ 0.81 ± 0.01 โมลต่อโมล และ 0.48 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



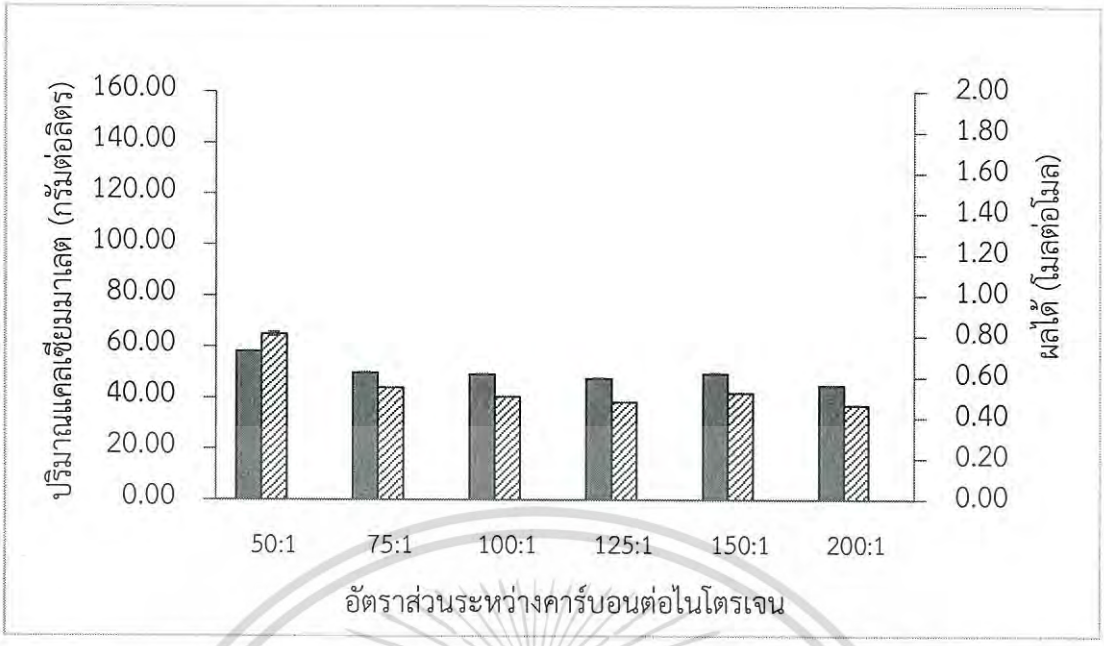
(A)



(B)

รูปที่ 4.6 กราฟแสดงปริมาณกลูโคสที่เหลือ (A) และค่าพีเอช (B) ที่เวลาต่างๆ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงไอโซเลต AG2 ในอาหาร basic medium ที่มีอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 50:1 (△) 75:1 (●) 100:1 (◆) 125:1 (□) 150:1 (▲) และ 200:1 (○)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.7 กราฟแสดงปริมาณแคลเซียมมาเลต และผลได้ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงไอโซเลต AG2 ในอาหาร basic medium ที่มีอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 50:1 75:1 100:1 125:1 150:1 และ 200:1 ตามลำดับ เป็นเวลา 5 วัน โดย ▭ คือ ปริมาณแคลเซียมมาเลต (กรัมต่อลิตร) และ ▨ คือ ผลได้ (โมลต่อโมล)

4.2.2 ผลของอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่อการผลิตกรดมาลิคของไอโซเลต NEW1

จากตารางที่ 4.2 พบว่า เมื่อทำการเพาะเลี้ยงไอโซเลต NEW1 ในอาหาร calcium malate production ที่มีอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน 10:1 20:1 30:1 40:1 50:1 และ 100:1 พบว่าไอโซเลต NEW1 สามารถผลิตแคลเซียมมาเลตได้ 41.45 ± 0.19 43.57 ± 0.17 48.00 ± 1.06 45.23 ± 0.36 37.24 ± 1.08 และ 138.18 ± 1.54 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งผลได้และอัตราการผลิตสูงสุดเท่ากับ 1.88 ± 0.02 โมลต่อโมล และ 1.44 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงไอโซเลต NEW1 ในอาหาร ในอาหาร calcium malate production ที่มีอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 100:1

เมื่อนำตัวอย่างในแต่ละวันมาวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และพีเอช พบว่าเมื่อทำการเพาะเลี้ยงไอโซเลต NEW1 ในอาหาร calcium malate production ที่มีอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 10:1 เป็นเวลา 3 วัน ค่าน้ำตาลลดลงอย่างเป็นลำดับตั้งแต่ 125.76 59.90 40.26 และ 5.41 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 4 ปริมาณน้ำตาลลดลงเล็กน้อยเหลือ 3.71 กรัมต่อลิตร จากข้อมูลข้างต้นแสดงให้เห็นว่าปริมาณน้ำตาลที่เหลือในระบบมีเพียงเล็กน้อยเท่านั้น (รูปที่ 4.8 A (△))

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในขณะที่ค่าพีเอช ลดลงจาก 6.9 เหลือ 5.4 ในวันที่ 1 โดยเป็นค่าพีเอชที่ลดลงต่ำสุดตลอดระยะเวลาที่ทำการเพาะเลี้ยง หลังจากนั้นค่าพีเอชเพิ่มขึ้นเป็น 5.4 6.0 และ 6.5 ตามลำดับ (รูปที่ 4.8 B (△)) เมื่อทำการเพาะเลี้ยงไอโซเลต NEW1 ในอาหาร calcium malate production ที่มีอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 20:1 พบว่ามีค่าน้ำตาลเริ่มต้น 103.81 กรัมต่อลิตร วันที่ 1 ลดลงมากถึง 57.57 กรัมต่อลิตร เหลือ 46.24 กรัมต่อลิตร วันที่ 2 ลดลง 23.43 กรัมต่อลิตร เหลือ 22.81 กรัมต่อลิตร วันที่ 3 ลดลง 16.28 กรัมต่อลิตร เหลือ 6.53 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 4 เหลือ 6.42 กรัมต่อลิตร ซึ่งในระยะเวลา 3 วันแรก ปริมาณน้ำตาลลดลงอย่างต่อเนื่องจนกระทั่ง วันที่ 4 พบว่ามีค่าน้ำตาลลดลงจากวันที่ 3 เพียงเล็กน้อยเท่านั้น (รูปที่ 4.8 A (●)) ขณะที่ค่าพีเอชเริ่มต้นที่ 6.83 ลดลงเหลือ 5.40 ในวันที่ 1 และเพิ่มขึ้นเป็น 5.51 6.68 และ 6.74 ตามลำดับ (รูปที่ 4.8 B (●))

เมื่อทำการเพาะเลี้ยงไอโซเลต NEW1 ในอาหาร calcium malate production ที่มีอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 30:1 มีค่าน้ำตาลเริ่มต้น 96.05 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 1 ลดลง 36.10 กรัมต่อลิตร เหลือ 59.95 กรัมต่อลิตร วันที่ 2 ลดลง 41.05 กรัมต่อลิตร เหลือ 18.90 กรัมต่อลิตร วันที่ 3 ลดลง 15.30 กรัมต่อลิตร เหลือ 3.60 กรัมต่อลิตร ซึ่งปริมาณเหลือใกล้เคียงกับวันที่ 4 คือ 5.97 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 4.8 A (◆)) ขณะที่ค่าพีเอชเริ่มต้น 6.8 ลดลงเหลือ 5.7 ในวันที่ 1 จากนั้นค่าพีเอชเพิ่มขึ้นเท่ากับ 5.7 6.9 และ 7.2 ตามลำดับ ซึ่งมีค่าพีเอชสูงที่สุดในวันที่ 4 (รูปที่ 4.8 B (◆))

เมื่อทำการเพาะเลี้ยงไอโซเลต NEW1 ในอาหาร calcium malate production ที่มีอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 40:1 มีค่าน้ำตาลเริ่มต้น 102.90 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 1 ปริมาณน้ำตาลลดลงมากถึง 97.30 กรัมต่อลิตร เหลือ 5.60 กรัมต่อลิตร หลังจากนั้นในวันที่ 2 ถึงวันที่ 4 ปริมาณน้ำตาลที่คงเหลือในระบบใกล้เคียงกัน คือ 5.69 6.90 และ 7.15 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (รูปที่ 4.8 A (□)) ขณะที่ค่าพีเอชลดลงต่ำสุดในวันที่ 1 ซึ่งลดลงจาก 6.6 กรัมต่อลิตร เหลือ 5.6 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 2 ถึงวันที่ 4 ค่าพีเอชเพิ่มขึ้น 5.7 6.9 และ 7.2 ตามลำดับ (รูปที่ 4.8 B (□))

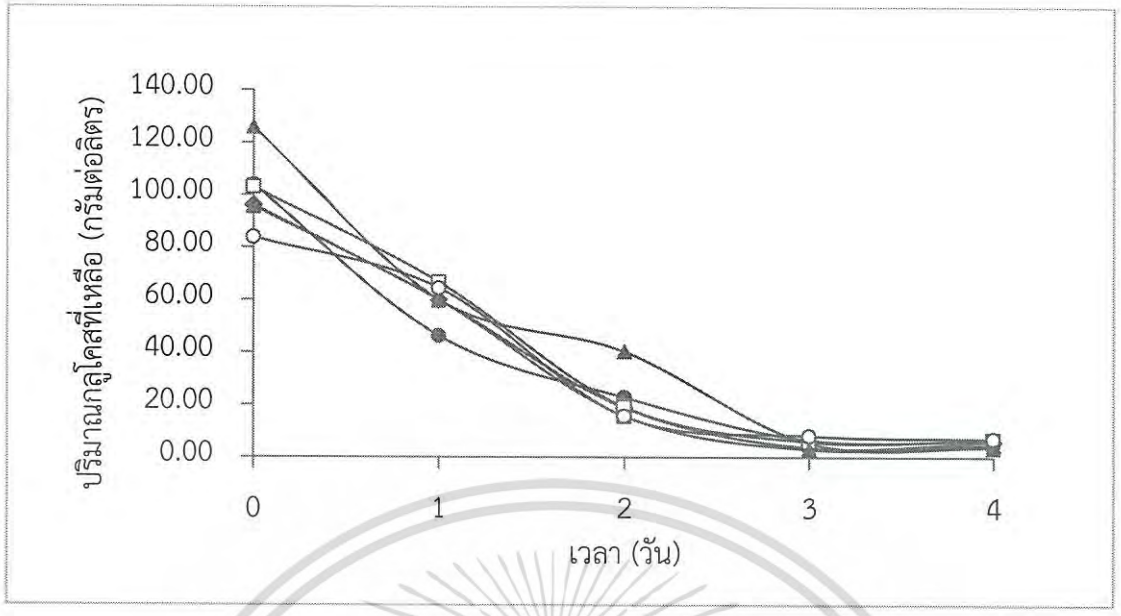
เมื่อทำการเพาะเลี้ยงไอโซเลต NEW1 ในอาหาร calcium malate production ที่มีอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 50:1 มีค่าน้ำตาลเริ่มต้น 95.52 กรัมต่อลิตร วันที่ 1 ลดลง 35.62 กรัมต่อลิตร เหลือ 59.90 กรัมต่อลิตร วันที่ 2 ลดลง 44.16 กรัมต่อลิตร เหลือ 15.74 กรัมต่อลิตร วันที่ 3 น้ำตาลลดลง 12.70 กรัมต่อลิตร เหลือ 3.04 กรัมต่อลิตร ซึ่งปริมาณน้ำตาลที่เหลือใกล้เคียงกับวันที่ 4 คือ 4.80 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 4.8 A (▲)) ขณะที่ค่าพีเอชลดลงต่ำสุดในวันที่ 1 ซึ่งลดลงจาก 6.8 เหลือ 5.7 ส่วนวันที่ 2 ถึงวันที่ 4 ค่าพีเอชเพิ่มขึ้นเล็กน้อย 5.9 7.0 และ 7.2 ตามลำดับ (รูปที่ 4.8 B (▲))

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

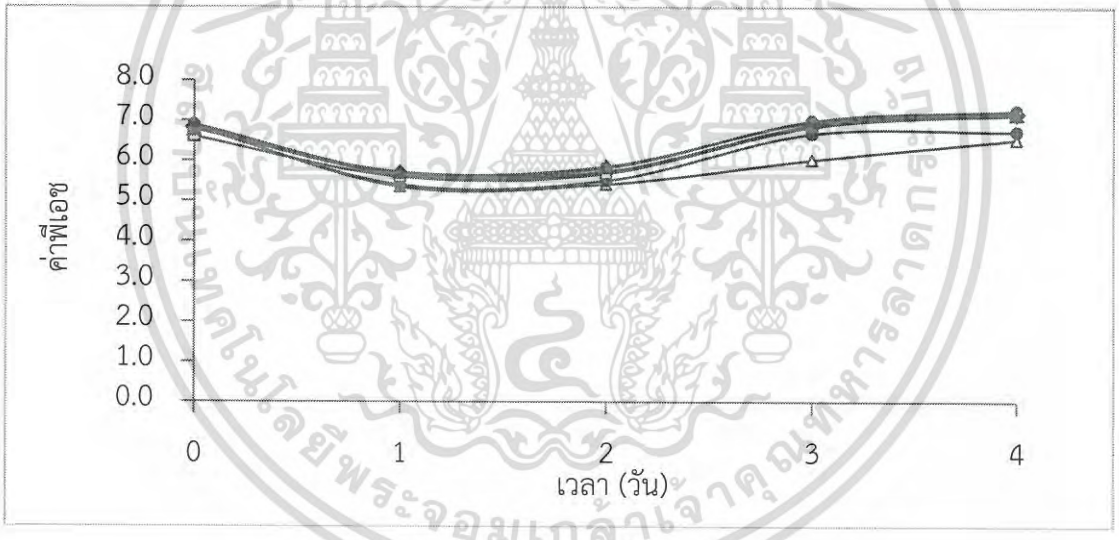
เมื่อทำการเพาะเลี้ยงไอโซเลต NEW1 ในอาหาร calcium malate production ที่มีอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 100:1 มีค่าน้ำตาลลดลงตั้งแต่ 83.76 กรัมต่อลิตร วันที่ 1 ลดลงมากถึง 19.29 กรัมต่อลิตร เหลือ 64.47 กรัมต่อลิตร วันที่ 2 ลดลง 48.92 กรัมต่อลิตร เหลือ 15.55 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 3 ลดลง 7.38 กรัมต่อลิตร เหลือ 8.17 กรัมต่อลิตร ซึ่งปริมาณน้ำตาลในวันที่ 4 เหลือใกล้เคียงกับวันที่ 3 คือ 6.99 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 4.8 A (○)) ขณะที่ค่าพีเอชลดลงต่ำสุดในวันที่ 1 ซึ่งลดลงจาก 6.90 เหลือ 5.7 ส่วนวันที่ 2 ถึงวันที่ 4 ค่าพีเอชเพิ่มขึ้นเล็กน้อย 5.8 7.0 และ 7.3 ตามลำดับ (รูปที่ 4.8 B (○))

เมื่อเปรียบเทียบที่อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน 10:1 20:1 30:1 40:1 50:1 และ 100:1 พบว่าแนวโน้มปริมาณน้ำตาลมีการลดลงอย่างต่อเนื่อง จนกระทั่งในวันที่ 3 มีน้ำตาลเหลือในระบบเพียงเล็กน้อย และมีค่าน้ำตาลใกล้เคียงกับวันที่ 4 ซึ่งในอาหารที่มีอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 100:1 มีปริมาณกลูโคสเหลือมากที่สุดเท่ากับ 6.99 กรัมต่อลิตร รองลงมาคืออาหารที่มีอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 40:1 20:1 30:1 และ 50:1 เหลือน้ำตาล 6.72 6.42 5.97 และ 4.80 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และในอาหารที่มีอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 10:1 มีปริมาณกลูโคสเหลือน้อยที่สุดเท่ากับ 3.71 กรัมต่อลิตร ในขณะที่ลักษณะการลดลงของค่าพีเอชคล้ายกันคือ ค่าพีเอชลดลงในวันที่ 1 จากนั้นจะเพิ่มขึ้นเล็กน้อยจนกระทั่งสิ้นสุดระยะเวลาการเพาะเลี้ยง และในวันสุดท้ายค่าพีเอชที่สูงที่สุดคือ ในอาหารที่มีอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 100:1 โดยมีค่าพีเอชเท่ากับ 7.3 ในขณะที่ในอาหารที่มีอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 20:1 30:1 40:1 และ 50:1 มีค่าพีเอชใกล้เคียงกันคือ 6.7 7.2 7.2 และ 7.2 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบปริมาณแคลเซียมมาเลตที่ได้ (รูปที่ 4.9) พบว่าในอาหารที่มีอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 10:1 20:1 30:1 40:1 และ 50:1 มีแนวโน้มใกล้เคียงกัน คือสามารถผลิตแคลเซียมมาเลตได้เท่ากับ 41.45 ± 0.19 43.57 ± 0.17 48.00 ± 1.06 45.23 ± 0.36 และ 37.24 ± 1.08 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างจากการเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 100:1 พบว่าไอโซเลต NEW1 สามารถผลิตแคลเซียมมาเลตได้ปริมาณสูงสุดเท่ากับ 138.8 ± 1.54 กรัมต่อลิตร ซึ่งสอดคล้องกับค่าผลได้และอัตราการผลิตที่สูงที่สุดเท่ากับ 1.88 ± 0.02 โมลต่อโมล และ 1.44 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



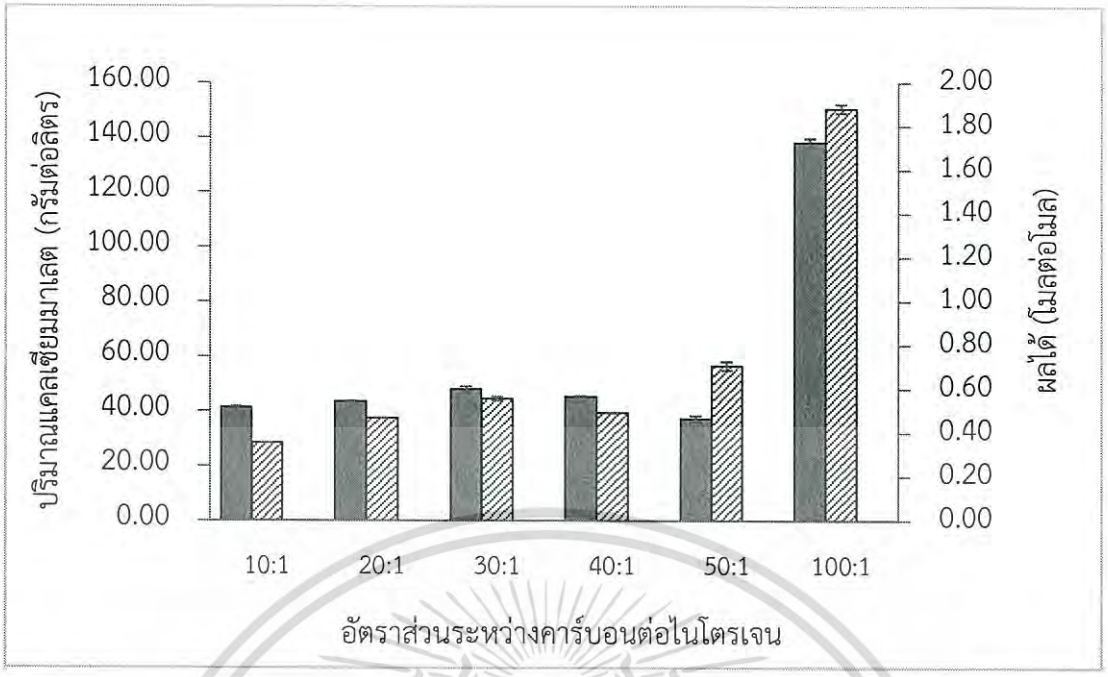
(A)



(B)

รูปที่ 4.8 กราฟแสดงปริมาณกลูโคสที่เหลือ (A) และค่าพีเอช (B) ที่เวลาต่างๆ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงไอโซเลต NEW1 ในอาหาร calcium malate production ที่มีอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 10:1 (△) 20:1 (●) 30:1 (◆) 40:1 (□) 50:1 (▲) และ 100:1 (○)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.9 กราฟแสดงปริมาณแคลเซียมมาเลต และผลได้ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงไอโซเลต NEW1 ในอาหาร calcium malate production ที่มีอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 10:1 20:1 30:1 40:1 50:1 และ 100:1 เป็นเวลา 4 วัน โดย ▭ คือ ปริมาณแคลเซียมมาเลต (กรัมต่อลิตร) และ ▨ คือ ผลได้ (โมลต่อโมล)

จากผลการศึกษาอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่อการผลิตแคลเซียมมาเลตของไอโซเลต AG2 และ NEW1 พบว่าเมื่อทำการเพาะเลี้ยงไอโซเลต AG2 ในอาหาร basic medium ที่มีอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 75:1 100:1 125:1 150:1 และ 200:1 สามารถผลิตแคลเซียมมาเลตได้ปริมาณใกล้เคียงกัน และในอาหารที่มีอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่ำสุดคือ 50:1 สามารถผลิตแคลเซียมมาเลตได้สูงที่สุด เมื่อทำการเพาะเลี้ยงไอโซเลต NEW1 ในอาหาร calcium malate production ที่มีอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 10:1 20:1 30:1 40:1 และ 50:1 สามารถผลิตแคลเซียมมาเลตได้ปริมาณใกล้เคียงกัน แต่ในอาหารที่มีอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนสูงที่สุดเท่ากับ 100:1 สามารถผลิตแคลเซียมมาเลตได้สูงที่สุด จากข้อมูลข้างต้น จะเห็นได้ว่าไอโซเลต AG2 สามารถผลิตแคลเซียมมาเลตได้สูงสุด เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่ำที่สุดหรือมีปริมาณไนโตรเจนมากที่สุด ส่วนไอโซเลต NEW1 สามารถผลิตแคลเซียมมาเลตได้สูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนสูงที่สุดหรือมีปริมาณไนโตรเจนน้อยที่สุด ซึ่งอาจเกิดจากการผลิตกรดอินทรีย์เริ่มขึ้นหลังจากที่ปริมาณไนโตรเจนหมด เนื่องจากไนโตรเจนมีผลต่อการผลิตชีวมวล การเติมปริมาณไนโตรเจนในระดับที่เหมาะสมสามารถทำให้จุลินทรีย์เจริญเติบโตและยังเหลือปริมาณกลูโคสที่เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับนำไปใช้ในการผลิตกรดอินทรีย์อีกด้วย แต่การจำกัดปริมาณไนโตรเจนอาจทำให้มีการเริ่มผลิตกรดอินทรีย์ช้า ซึ่งแตกต่างจากรายงานของ Ochsenreither และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คณะ (2014) ศึกษาผลของอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่อการผลิตกรดมาลิค โดยทำการเพาะเลี้ยง *A. oryzae* DSM1863 ในอาหารเหลวแบบเขย่า ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 353 ชั่วโมง พบว่าอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนไม่มีผลต่อการผลิตกรดมาลิค โดยอัตราส่วนที่มากที่สุดและน้อยที่สุดสามารถผลิตกรดมาลิคได้เท่ากับ 52 และ 55 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ แต่ในทางตรงกันข้ามสามารถผลิตกรดฟูมาริคได้ในปริมาณที่แตกต่างกันคือ อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนสูงสุด สามารถผลิตกรดฟูมาริคได้ 8.44 กรัมต่อลิตร และอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่ต่ำที่สุดสามารถผลิตกรดฟูมาริคได้ 0.70 กรัมต่อลิตร ดังนั้นอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่แตกต่างกันจึงไม่มีผลต่อการผลิตกรดมาลิคแต่มีอิทธิพลต่อการผลิตกรดฟูมาริค

นอกจากนี้การผลิตกรดมาลิคมีเอนไซม์ที่สำคัญคือ เอนไซม์มาเลตดีไฮโดรจีเนส (malate dehydrogenase) ที่ทำหน้าที่เปลี่ยนออกซาโลอะซิเตต (oxaloacetete) ไปเป็นมาเลต (malate) ในกระบวนการ reductive TCA cycle ซึ่งจากข้อมูลการตรวจสอบการแสดงออกของยีนพบว่าการที่เซลล์สามารถผลิตพลังงานได้ในสภาวะที่เกิดกระบวนการ reductive TCA cycle อาจทำได้โดยกระตุ้นการแสดงออกของยีน มาเลตดีไฮโดรจีเนส (malate dehydrogenase) ในสภาวะจำกัดปริมาณไนโตรเจน ส่งผลให้การทำงานของเอนไซม์ ไพรูเวตคาร์บอกซิเลส (pyruvate carboxylase) ต่ำกว่า เอนไซม์มาเลตดีไฮโดรจีเนส (malate dehydrogenase) ดังนั้นความเข้มข้นของไนโตรเจนเริ่มต้น และ การปรับอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนจึงเหมาะสำหรับการพัฒนาประสิทธิภาพการผลิตกรดอินทรีย์ เพราะมีอิทธิพลต่อการผลิตกรดอินทรีย์ (Knuf และคณะ, 2013)

4.3 ผลของชนิดของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตกรดมาลิค

จากการทดลองในหัวข้อ 4.1 ศึกษาผลของสูตรอาหารต่อการผลิตแคลเซียมมาเลต พบว่าเมื่อทำการเพาะเลี้ยงไอโซเลต AG2 ในอาหาร basic medium สามารถผลิตแคลเซียมมาเลตได้สูงที่สุด 65.24 ± 0.11 กรัมต่อลิตร และผลได้สูงสุดอยู่ที่ 0.71 โมลต่อโมล ในขณะที่เมื่อทำการเพาะเลี้ยงไอโซเลต NEW1 ในอาหาร calcium malate production สามารถผลิตแคลเซียมมาเลตได้สูงที่สุด 56.62 ± 0.26 กรัมต่อลิตร และผลได้สูงสุดอยู่ที่ 0.60 ± 0.00 โมลต่อโมล ดังนั้นจึงได้เลือกใช้อาหารเหล่านี้มาทำการ ศึกษาผลของชนิดของแหล่งคาร์บอนได้แก่ กลูโคส ไซโลส กากน้ำตาลไม่ปรับสภาพ กากน้ำตาลปรับสภาพ ซูโครส และกลีเซอรอล ต่อการผลิตแคลเซียมมาเลตของไอโซเลต AG2 และ NEW1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยทำการเพาะเลี้ยงไอโซเลต AG2 ในอาหาร basic medium ส่วนไอโซเลต NEW1 ทำการเพาะเลี้ยงในอาหาร calcium malate production และเติมกลูโคสเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร และทำการเปลี่ยนชนิดของแหล่งคาร์บอนจากกลูโคส เป็น ไซโลส กากน้ำตาลไม่ปรับสภาพ กากน้ำตาลปรับสภาพ ซูโครส และกลีเซอรอล โดยกำหนดให้ปริมาณร้อยละคาร์บอนในแต่ละแหล่งคาร์บอนให้เท่ากับจำนวนคาร์บอนในน้ำตาลกลูโคส 100 กรัมต่อลิตร ทำการเพาะเลี้ยงที่สภาวะเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงไอโซเลต AG2 และ NEW1 เท่ากันคือ 5 วัน จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาทีเพื่อแยกตะกอนเซลล์ออก และนำส่วนใสที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณแคลเซียมมาเลต ด้วยวิธีตกตะกอนด้วยเมทานอล และการไทรเทรตหาปริมาณแคลเซียมมาเลต ตามลำดับ พร้อมทั้งวัดค่าพีเอช และวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธีดีเอนเอส (DNS method) และวัดปริมาณน้ำตาลทั้งหมดวิธีฟีนอลซัลฟูริค ผลการทดลองที่ได้แสดงดังตารางที่ 4.3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 แสดงผลของชนิดของแหล่งคาร์บอนได้แก่ กลูโคส ไซโลส กากน้ำตาลไม่ปรับสภาพ กากน้ำตาลปรับสภาพ ซูโครส และกลีเซอรอล ต่อปริมาณแคลเซียมมาเลต ผลได้และอัตราการผลิตของไอโซเลต AG2 และ NEW1 ตามลำดับ

ไอโซเลต	แหล่งคาร์บอน	ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	แคลเซียมมาเลต (กรัมต่อลิตร)	ผลได้ (โมลต่อโมล)	อัตราการผลิต (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)	ค่าพีเอชวันสุดท้าย
AG2	กลูโคส	103.57	6.83	48.21 ± 0.25	0.52 ± 0.00	0.40	6.2
	ไซโลส	101.05	33.43	8.40 ± 0.05	0.11 ± 0.00	0.07	6.3
	กากน้ำตาลไม่ปรับสภาพ	217.42	113.12	54.69 ± 1.78	0.55 ± 0.02	0.46	5.8
	กากน้ำตาลปรับสภาพ	200.43	98.06	78.08 ± 6.35	0.80 ± 0.06	0.65	5.5
	ซูโครส	91.54	46.25	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00	7.1
	กลีเซอรอล	-	-	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00	-
NEW1	กลูโคส	112.48	5.63	42.05 ± 0.41	0.41 ± 0.00	0.35	7.0
	ไซโลส	106.86	5.76	41.11 ± 0.27	0.35 ± 0.00	0.34	4.9
	กากน้ำตาลไม่ปรับสภาพ	245.81	137.85	47.56 ± 0.71	0.46 ± 0.01	0.40	6.2
	กากน้ำตาลปรับสภาพ	182.80	98.06	74.83 ± 1.47	0.92 ± 0.02	0.62	6.2
	ซูโครส	95.91	45.13	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00	7.0
	กลีเซอรอล	-	-	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00	-

4.3.1 ผลของชนิดของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตกรดมาลิคโดยไอโซเลต AG2

สำหรับไอโซเลต AG2 เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหาร basic medium ที่มีคาร์บอนแตกต่างกันได้แก่ กลูโคส ไซโลส กากน้ำตาลไม่ปรับสภาพ กากน้ำตาลปรับสภาพ ซูโครส และ กลีเซอรอล พบว่า ไอโซเลต AG2 สามารถผลิตแคลเซียมมาเลตได้เท่ากับ 48.21 ± 0.25 8.40 ± 0.05 54.69 ± 1.78 78.08 ± 6.35 0.00 ± 0.00 และ 0.00 ± 0.00 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งผลได้และอัตราการผลิตสูงที่สุดเท่ากับ 0.80 ± 0.06 โมลต่อโมล และ 0.65 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงโดยใช้กากน้ำตาลปรับสภาพเป็นแหล่งคาร์บอน (ตารางที่ 4.3)

เมื่อทำการเพาะเลี้ยงไอโซเลต AG2 ในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น 103.57 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5 วัน ปริมาณน้ำตาลลดลง 86.5 กรัมต่อลิตร เหลือในระบบเพียง 17.07 กรัมต่อลิตร ค่าพีเอชเริ่มต้น 6.0 และในวันสุดท้ายมีค่าพีเอชเพิ่มขึ้นเป็น 6.2 (ตารางที่ 4.3)

เมื่อทำการเพาะเลี้ยงไอโซเลต AG2 ในอาหารที่มีไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น 101.04 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5 วัน ปริมาณน้ำตาลลดลง 87.67 กรัมต่อลิตร เหลือในระบบเพียง 13.37 กรัมต่อลิตร ค่าพีเอชเริ่มต้น 6.4 ใกล้เคียงกับค่าพีเอชในวันสุดท้ายคือ 6.3 (ตารางที่ 4.3)

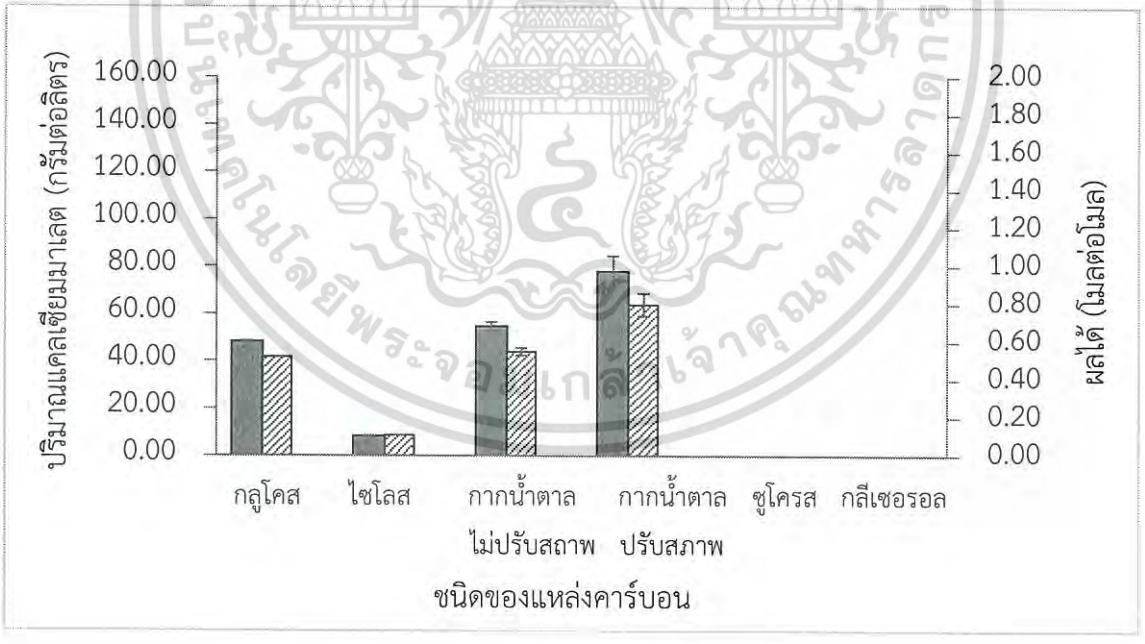
เมื่อทำการเพาะเลี้ยงไอโซเลต AG2 ในอาหารที่มีกากน้ำตาลปรับสภาพเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น 200.43 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5 วัน ปริมาณน้ำตาลลดลง 102.37 กรัมต่อลิตร เหลือในระบบ 98.06 กรัมต่อลิตร ค่าพีเอชเริ่มต้น 5.9 ใกล้เคียงกับค่าพีเอชในวันสุดท้าย 5.8 (ตารางที่ 4.3)

เมื่อทำการเพาะเลี้ยงไอโซเลต AG2 ในอาหารที่มีกากน้ำตาลไม่ปรับสภาพเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น 217.42 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5 วัน ปริมาณน้ำตาลลดลง 104.30 กรัมต่อลิตร เหลือในระบบ 113.12 กรัมต่อลิตร ค่าพีเอชเริ่มต้น 5.5 ใกล้เคียงกับค่าพีเอชในวันสุดท้ายคือ 5.6 (ตารางที่ 4.3)

เมื่อทำการเพาะเลี้ยงไอโซเลต AG2 ในอาหารที่มีซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น 91.54 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5 วัน ปริมาณน้ำตาลลดลง 45.29 กรัมต่อลิตร เหลือในระบบ 46.25 กรัมต่อลิตร ค่าพีเอชเริ่มต้น 6.7 ในวันสุดท้ายค่าพีเอชเพิ่มขึ้นเป็น 7.1 (ตารางที่ 4.3)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อทำการเปรียบเทียบแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ได้แก่ กลูโคส ไซโลส กากน้ำตาลไม่ปรับสภาพ กากน้ำตาลปรับสภาพ ซูโครส และกลีเซอรอล พบว่าในวันสุดท้ายแนวโน้มปริมาณน้ำตาลมีการลดลงเมื่อเทียบกับปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นโดยเมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ปริมาณน้ำตาลที่ถูกใช้ไปใกล้เคียงกับไซโลสคือ 86.5 และ 87.67 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีปริมาณน้ำตาลลดลงมากกว่าซูโครส และเมื่อเทียบระหว่างกากน้ำตาลปรับสภาพ กับ กากน้ำตาลไม่ปรับสภาพ เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าปริมาณน้ำตาลที่ถูกใช้ไปใกล้เคียงกัน เมื่อเทียบค่าพีเอช พบว่าอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนคือ กลูโคส และซูโครส มีค่าพีเอชเพิ่มขึ้นเล็กน้อย ในขณะที่ ไซโลส กลีเซอรอล กากน้ำตาลปรับสภาพ และกากน้ำตาลไม่ปรับสภาพ ในวันสุดท้ายมีค่าพีเอชไม่แตกต่างจากวันแรก และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณแคลเซียมมาเลต พบว่าแหล่งคาร์บอนที่ไอโซเลต AG2 สามารถนำมาผลิตแคลเซียมมาเลตได้มากที่สุดคือ กากน้ำตาลปรับสภาพ กากน้ำตาลไม่ปรับสภาพ กลูโคส และไซโลส โดยสามารถผลิตแคลเซียมมาเลตได้ 78.08 ± 6.35 54.69 ± 1.78 48.21 ± 0.25 และ 8.40 ± 0.05 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในขณะที่เมื่อใช้ซูโครสและกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนไอโซเลต AG2 ไม่สามารถนำมาผลิตแคลเซียมมาเลตได้ (รูปที่ 4.10) ซึ่งแหล่งคาร์บอนที่ไอโซเลต AG2 สามารถนำมาผลิตแคลเซียมมาเลตได้มากที่สุดคือ กากน้ำตาลปรับสภาพ สอดคล้องกับค่าผลได้และอัตราการผลิตที่สูงที่สุดเท่ากับ 0.80 ± 0.06 โมลต่อโมล และ 0.65 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงตามลำดับ



รูปที่ 4.10 กราฟแสดงปริมาณแคลเซียมมาเลต และผลได้ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงไอโซเลต AG2 ในอาหาร basic medium ที่มี กลูโคส ไซโลส กากน้ำตาลไม่ปรับสภาพ กากน้ำตาลปรับสภาพ ซูโครส และกลีเซอรอล เป็นแหล่งคาร์บอน เป็นระยะเวลา 5 วัน โดย ▩ คือ ปริมาณแคลเซียมมาเลต (กรัมต่อลิตร) และ ▨ คือ ผลได้ (โมลต่อโมล)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.2 ผลของชนิดของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตกรดมาลิคโดยไอโซเลต NEW1

สำหรับไอโซเลต NEW1 เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหาร calcium malate production ที่มีแหล่งคาร์บอนแตกต่างกันได้แก่ กลูโคส ไซโลส กากน้ำตาลไม่ปรับสภาพ กากน้ำตาลปรับสภาพ ซูโครส และกลีเซอรอล พบว่า ไอโซเลต NEW1 สามารถผลิตแคลเซียมมาเลตได้ 42.05 ± 0.41 41.11 ± 0.27 47.56 ± 0.71 74.83 ± 1.47 0.00 ± 0.00 และ 0.00 ± 0.00 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งให้ค่าผลได้และอัตราการผลิตสูงที่สุดเท่ากับ 0.92 ± 0.02 โมลต่อโมล และ 0.62 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีกากน้ำตาลปรับสภาพเป็นแหล่งคาร์บอน (ตารางที่ 4.3)

เมื่อทำการเพาะเลี้ยงไอโซเลต NEW1 ในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น 112.48 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5 วัน ปริมาณน้ำตาลลดลง 106.85 กรัมต่อลิตร เหลือในระบบเพียง 5.63 กรัมต่อลิตร ค่าพีเอชเริ่มต้น 6.7 และในวันสุดท้ายมีค่าพีเอชเพิ่มขึ้นเป็น 7.0 (ตารางที่ 4.3)

เมื่อทำการเพาะเลี้ยงไอโซเลต NEW1 ในอาหารที่มีไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น 106.86 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5 วัน ปริมาณน้ำตาลลดลง 101.10 กรัมต่อลิตร เหลือในระบบเพียง 5.76 กรัมต่อลิตร ค่าพีเอชเริ่มต้น 6.9 และในวันสุดท้ายมีค่าพีเอชลดลงเหลือ 4.9 (ตารางที่ 4.3)

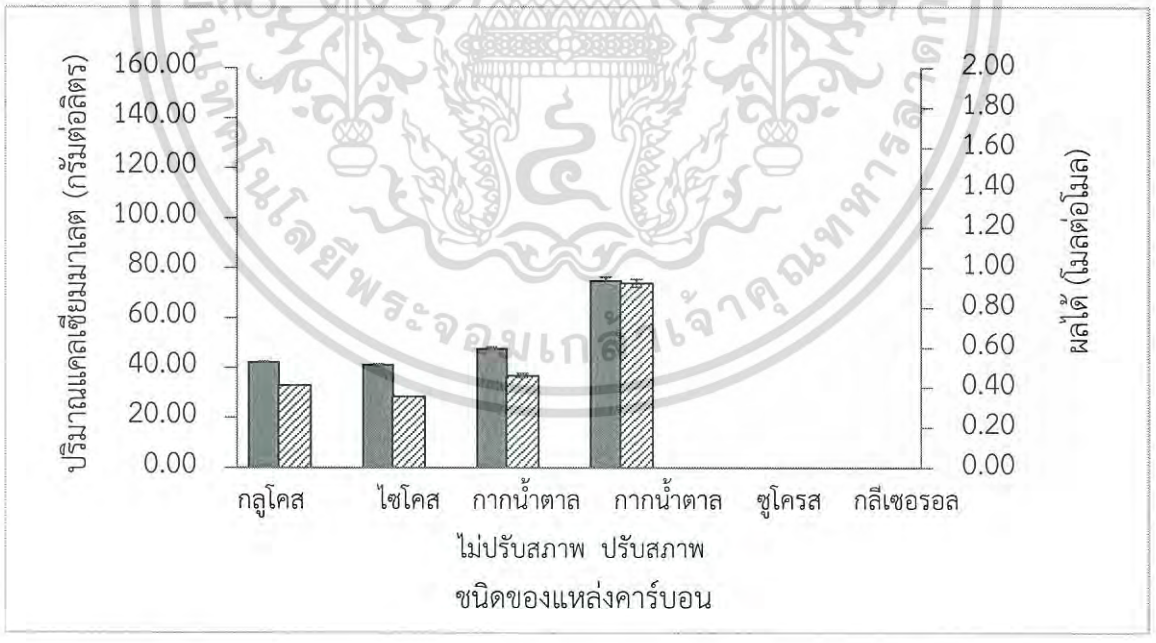
เมื่อทำการเพาะเลี้ยงไอโซเลต NEW1 ในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนคือกากน้ำตาลปรับสภาพ พบว่าปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น 182.80 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5 วัน ปริมาณน้ำตาลลดลง 84.74 กรัมต่อลิตร เหลือในระบบ 98.06 กรัมต่อลิตร ค่าพีเอชเริ่มต้น 6.1 ใกล้เคียงกับค่าพีเอชในวันสุดท้ายคือ 6.2 (ตารางที่ 4.3)

เมื่อทำการเพาะเลี้ยงไอโซเลต NEW1 ในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนคือกากน้ำตาลไม่ปรับสภาพ พบว่าปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น 245.81 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5 วัน ปริมาณน้ำตาลลดลง 107.96 กรัมต่อลิตร เหลือในระบบ 137.85 กรัมต่อลิตร ค่าพีเอชเริ่มต้น 6.1 ใกล้เคียงกับค่าพีเอชในวันสุดท้ายคือ 6.2 (ตารางที่ 4.3)

เมื่อทำการเพาะเลี้ยงไอโซเลต NEW1 ในอาหารที่มีซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น 95.91 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5 วัน ปริมาณน้ำตาลลดลงเพียง 50.78 กรัมต่อลิตร เหลือในระบบมากถึง 45.13 กรัมต่อลิตร ค่าพีเอชเริ่มต้น 7.0 และในวันสุดท้ายมีค่าพีเอชเพิ่มขึ้นเป็น 7.3 (ตารางที่ 4.3)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อเปรียบเทียบแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ได้แก่ กลูโคส ไซโลส กากน้ำตาลไม่ปรับสภาพ กากน้ำตาลปรับสภาพ ซูโครส และ กลีเซอรอล พบว่าในวันสุดท้ายแนวโน้มปริมาณน้ำตาลมีการลดลงเมื่อเทียบกับปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น โดยเมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ปริมาณน้ำตาลที่ถูกใช้ไปใกล้เคียงกับไซโลสคือ 106.85 และ 101.10 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งมีปริมาณน้ำตาลลดลงมากกว่าซูโครส และเมื่อเทียบระหว่างการใช้กากน้ำตาลปรับสภาพ และกากน้ำตาลไม่ปรับสภาพ เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าปริมาณน้ำตาลที่ถูกใช้ไปใกล้เคียงกัน เมื่อเทียบค่าพีเอชพบว่าอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนเป็น กลูโคส และซูโครส มีค่าพีเอชเพิ่มขึ้นเล็กน้อย ในขณะที่อาหารที่มีไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอนมีค่าพีเอชลดลง ส่วนการใช้กากน้ำตาลปรับสภาพและกากน้ำตาลไม่ปรับสภาพเป็นแหล่งคาร์บอน ในวันสุดท้ายมีค่าพีเอชไม่แตกต่างจากวันแรก และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณแคลเซียมมาเลต พบว่าแหล่งคาร์บอนที่ไอโซเลต NEW1 สามารถนำมาผลิตแคลเซียมมาเลตได้สูงที่สุดคือ กากน้ำตาลปรับสภาพ รองลงมาได้แก่ กากน้ำตาลไม่ปรับสภาพ ไซโลส และกลูโคส โดยผลิตได้ 74.83 ± 1.47 47.56 ± 0.71 42.05 ± 0.41 และ 41.11 ± 0.27 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในขณะที่เมื่อใช้ซูโครสและกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าไอโซเลต NEW1 ไม่สามารถนำมาผลิตแคลเซียมมาเลตได้ (รูปที่ 4.11) ซึ่งแหล่งคาร์บอนที่ไอโซเลต NEW1 สามารถนำมาผลิตแคลเซียมมาเลตได้สูงที่สุดคือ กากน้ำตาลปรับสภาพ สอดคล้องกับค่าผลได้และอัตราการผลิตที่สูงที่สุดเท่ากับ 0.92 ± 0.02 โมลต่อโมล และ 0.62 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ



รูปที่ 4.11 กราฟแสดงปริมาณแคลเซียมมาเลต และผลได้ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงไอโซเลต NEW1 ในอาหาร calcium malate production ที่มี กลูโคส ไซโลส กากน้ำตาลไม่ปรับสภาพ กากน้ำตาลปรับสภาพ ซูโครส และกลีเซอรอล เป็นแหล่งคาร์บอน เป็นระยะเวลา 5 วัน โดย ▩ คือ ปริมาณแคลเซียมมาเลต (กรัมต่อลิตร) และ ▨ คือ ผลได้ (โมลต่อโมล)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการศึกษาผลของชนิดของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตกรดมาลิค พบว่าไอโซเลต AG2 สามารถใช้แหล่งคาร์บอน ได้แก่ กากน้ำตาลที่ปรับสภาพ กากน้ำตาลที่ไม่ปรับสภาพ กลูโคส และไซโลส สามารถผลิตแคลเซียมมาเลตได้เท่ากับ 78.08 ± 6.35 54.69 ± 1.78 48.21 ± 0.25 และ 8.40 ± 0.05 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และไอโซเลต NEW1 สามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้แก่ กากน้ำตาลปรับสภาพ กากน้ำตาลที่ไม่ปรับสภาพ ไซโลส และ กลูโคส และสามารถผลิตแคลเซียมมาเลตได้เท่ากับ 74.85 ± 1.47 47.56 ± 0.71 42.05 ± 0.41 และ 41.11 ± 0.27 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยทั้งไอโซเลต AG2 และ NEW1 สามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้หลากหลายอาจเกิดจากไอโซเลต AG2 และ NEW1 เป็นจุลินทรีย์ที่ไม่ได้ผ่านการทำพันธุวิศวกรรม เช่น งานวิจัยของ Ochsenreither และคณะ (2014) ได้ทำการเพาะเลี้ยง *A. oryzae* DSM1863 ซึ่งเป็นจุลินทรีย์สายพันธุ์ดั้งเดิมในการผลิตกรดมาลิคโดยใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ พบว่า *A. oryzae* DSM1863 สามารถผลิตกรดมาลิคได้ในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนหลายชนิด ได้แก่ กลีเซอรอลที่เป็นผลพลอยได้จากการผลิตไบโอดีเซล และน้ำตาลที่ได้จากการย่อยสลายลิกโนเซลลูโลส ซึ่งจะส่งผลให้ค่าใช้จ่ายในการผลิตต่ำลง อีกทั้งยังสามารถช่วยป้องกันการขาดแคลนด้านอาหารและพลังงานอีกด้วย

ไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ได้จากการย่อยสลายลิกโนเซลลูโลส ที่มีราคาไม่แพง (Mülleret และคณะ, 2012) เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม เมื่อผ่านการย่อยจะให้น้ำตาลที่มีคาร์บอน 5 อะตอม คือ ไซโลส เป็นหนึ่งในแหล่งน้ำตาลที่พบได้ในธรรมชาติ ให้ปริมาณมากถึงร้อยละ 25 ของน้ำหนักแห้งของชีวมวลพืชบางชนิด (Ladisch และคณะ, 1983) ดังนั้นไซโลส จึงเป็นน้ำตาลที่สำคัญชนิดหนึ่งเช่นกัน โดยเชื้อราบางชนิดสามารถใช้ไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตกรดอินทรีย์ได้ เช่น *Rhizopus oryzae* สามารถผลิตกรดแลคติค (Maas และคณะ, 2006) และเชื้อ *Aspergillus terreus* สามารถผลิตกรดอิทาโคนิค (Kahtola และคณะ, 1985) และจากการศึกษาข้อมูล พบว่าไซโลสไม่ได้ถูกนำมาใช้ในการผลิตกรดมาลิค แต่จะถูกนำมาเปลี่ยนเป็นไซลูโลส (Xylulose) แล้วเข้าสู่วิถีเพนโตสฟอสเฟต (pentose phosphate pathway) เปลี่ยนเป็นสารตัวกลาง 3 ชนิด คือ สารตัวกลางไกลโคไลติก (glycolytic intermediator) ฟรุกโตส-6-ฟอสเฟต (fructose-6-phosphate) กลีเซอรอลดีไฮด์-3-ฟอสเฟต (glyceroldehyde-3-phosephate) ซึ่งตามทฤษฎี เมื่อใช้ไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอนจะมีผลได้เท่ากับ 1.67 โมลกรดอินทรีย์ต่อ 1 โมลไซโลส ดังนั้นการผลิตกรดอินทรีย์จากไซโลสให้ผลได้ต่ำกว่าการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ดังนั้นการใช้ไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอนจึงเหมาะต่อการเจริญเติบโตของเซลล์มากกว่าการผลิตกรดอินทรีย์ ทั้งนี้ปริมาณกรดมาลิคที่ได้จากการใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของจุลินทรีย์อีกด้วย ดังนั้นการพัฒนาการผลิตกรดอินทรีย์ในอนาคตอาจจะนำไซโลส มาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในระยะที่เซลล์เจริญเติบโต (Ochsenreither และคณะ, 2014)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กากน้ำตาลเป็นผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมการผลิตน้ำตาลทราย ซึ่งจากการศึกษา พบว่าทั้งไอโซเลต AG2 และ NEW1 สามารถใช้กากน้ำตาลที่ปรับสภาพและไม่ปรับสภาพเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับผลิตกรดมาลิคได้ เนื่องจากกากน้ำตาลมีองค์ประกอบของสารอาหารที่หลากหลาย เช่น น้ำตาลฟรุกโตส กลูโคส ร้อยละ 62 และมีสารประกอบอนินทรีย์ร้อยละ 8 (Olbrich, 1963) จากผลการศึกษา พบว่าการใช้กากน้ำตาลที่ปรับสภาพแล้วเป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยงไอโซเลต AG2 และ NEW1 สามารถผลิตกรดมาลิคได้สูงกว่าการใช้กากน้ำตาลที่ไม่ได้ปรับสภาพ เนื่องจากวิธีการปรับสภาพนั้นมีการเติมกรดซัลฟูริคเพื่อย่อยสลายตะกอนของโลหะหนัก ซึ่งเป็นการลดส่วนประกอบที่เป็นพิษต่อเซลล์ โดยอาจส่งผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตและการทำงานของเอนไซม์ต่างๆ ทำให้มีผลต่อการผลิตกรดมาลิคลดลงได้ (Roukas และคณะ, 1998) จากนั้นทำการเติมแคลเซียมไฮดรอกไซด์ที่มีส่วนช่วยในการจับและตกตะกอนของโลหะหนักต่างๆเข้าไป ซึ่งจะช่วยทำให้การถ่ายเทของออกซิเจนในกากน้ำตาลดีขึ้น (Cao และคณะ, 2012) ดังนั้นกากน้ำตาลปรับที่สภาพแล้วจึงเหมาะสมต่อการใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตแคลเซียมมาเลตของไอโซเลต AG2 และ NEW1 ได้ดีกว่ากากน้ำตาลไม่ปรับสภาพ

น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งชีวมวลทางเลือกราคาถูก จากรายงานของ Magnuson และ Lasure (2004) ได้ศึกษาการเพาะเลี้ยง *Aspergillus* niger ในการผลิตกรดมาลิคในอาหารที่มีซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเชื้อ *A. niger* สามารถใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตกรดมาลิคได้ เนื่องจากจุลินทรีย์อาจจะมีวิถีเพนโตสฟอสเฟต (pentose phosphate pathway) และเอนไซม์อินเวอเทส (invertase) สำหรับการเปลี่ยนซูโครสให้เป็นกลูโคสเพื่อเข้าวิถีไกลโคไลซิส เพื่อนำไปเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์กรดมาลิคต่อไป และจากรายงานของ Cheng และคณะ (2017) ได้ทำการทดลองผลิตกรดมาลิคจากเชื้อ *Aureobasidium pullulans* ในอาหารที่มีซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าสามารถผลิตกรดมาลิคได้ 54.5 กรัมต่อลิตร เนื่องจากเชื้อ *A. pullulans* อาจมียีนแอลฟากาแลคโตซิเดส (α-galactosidase) และเบต้าฟูราโนซิเดส (β-furanosidases) หรือ ยีนที่ควบคุมการแสดงออกของเอนไซม์อินเวอเทส (invertase) ที่ทำให้สามารถใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนได้ (Yoshikawa และคณะ, 2006) แต่จากการทดลองพบว่าไอโซเลต AG2 และ NEW1 ไม่สามารถใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตกรดมาลิคได้ ซึ่งอาจเกิดจากไอโซเลต AG2 และ NEW1 ไม่มีวิถีหรือเอนไซม์ดังที่กล่าวมาข้างต้น

กลีเซอรอลเป็นผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล ซึ่งเป็นพลังงานทางเลือกอีกชนิดหนึ่งที่มีราคาถูกและยังสามารถนำมาใช้ผลิตกรดมาลิคได้ จากรายงานของ Zambanini และคณะ, (2016) ได้ศึกษาการผลิตกรดมาลิคจากเชื้อ *Ustilago trichophora* TZ1 ให้ปริมาณกรดมาลิคสูงสุดที่ 195 กรัมต่อลิตร ซึ่งจุลินทรีย์สามารถเปลี่ยนสารตั้งต้นกลีเซอรอลให้เป็นกรดอินทรีย์ที่มีคาร์บอน 4 อะตอม (C4 dicarbonic acid) เช่น มาเลต และซัคซิเนต โดยการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ผ่านเอนไซม์ไพรูเวตคาร์บอกซิเลส (pyruvate carboxylase) ซึ่งจากปฏิกิริยานี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไพรูเวต (pyruvate) และคาร์บอนไดออกไซด์ ก็จะเปลี่ยนไปเป็นออกซาโลอะซิเตต (oxaloacetate) เพื่อการสังเคราะห์กรดมาลิคต่อไป

นอกจากนั้น กลีเซอรอลดิบ/กลั่น สามารถนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าสูง เช่น เชื้อจุลินทรีย์ *Candida* sp. *Yarrowia* sp. และ *Aspergillus niger* สามารถผลิตกรดอินทรีย์จากกลีเซอรอลได้ จึงมีการนำมาประยุกต์ใช้กับ *Aspergillus* sp. สายพันธุ์อื่นๆ ในการผลิตกรดมาลิค ซึ่งกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตกรดอินทรีย์ของเชื้อ *A. oryzae* โดยกลีเซอรอลถูกเปลี่ยนเป็นไดไฮดรอกซีอะซิโตน ฟอสเฟต (dihydroxyacetone phosphate (DHAP)) ผ่านกระบวนการฟอสโฟไรเลชั่น (phosphorylation) และออกซิเดชั่น (oxidation) โดยใช้เอนไซม์กลีเซอรอล-3-ดีไฮโดรจีเนส (glycerol-3-dehydrogenase) เปลี่ยนเป็นสารตัวกลางที่สามารถเข้าสู่กระบวนการไกลโคไลซิสได้โดยตรง ผลได้ตามทฤษฎีคือ 1 โมลกรดอินทรีย์ต่อ 1 โมลกลีเซอรอล แต่จากการทดลองพบว่าทั้งไอโซเลต AG2 และ NEW1 ไม่สามารถใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตกรดมาลิคได้ซึ่งอาจเกิดจากไอโซเลต AG2 และ NEW1 ไม่มีวิถีหรือเอนไซม์ดังที่กล่าวมาข้างต้น แต่ในอนาคตอาจมีการปรับปรุงการเพิ่มปริมาณกรดมาลิคจากการใช้กลีเซอรอลได้โดยเพิ่มการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการแสดงออกของเอนไซม์ฟูมาเรส (fumarase) ทำให้เกิดปฏิกิริยาดึงโมเลกุลของน้ำออก (dehydration) ที่ส่งผลต่อการผลิตกรดมาลิคเพิ่มขึ้น (Ochsenreither และคณะ, 2014)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

1. เมื่อทำการศึกษาผลของสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตกรดมาลิคที่อยู่ในรูปของแคลเซียมมาเลตพบว่า ไอโซเลต AG2 ผลิตกรดแคลเซียมมาเลตได้สูงที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร basic medium โดยสามารถผลิตแคลเซียมมาเลตได้เท่ากับ 65.24 ± 0.18 กรัมต่อลิตร และพบว่าไอโซเลต NEW1 สามารถผลิตแคลเซียมมาเลตได้สูงที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร calcium malate production โดยสามารถผลิตแคลเซียมมาเลตได้เท่ากับ 56.62 ± 0.26 กรัมต่อลิตร

2. เมื่อทำการศึกษาผลของอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่อการผลิตแคลเซียมมาเลตพบว่า ไอโซเลต AG2 สามารถผลิตแคลเซียมมาเลตได้สูงที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร basic medium ที่มีอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 50:1 โดยสามารถผลิตแคลเซียมมาเลตได้เท่ากับ 58.17 ± 0.14 กรัมต่อลิตร และพบว่าไอโซเลต NEW1 สามารถผลิตแคลเซียมมาเลตได้สูงที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร calcium malate production ที่มีอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 100:1 โดยสามารถผลิตแคลเซียมมาเลตได้เท่ากับ 138.18 ± 1.54 กรัมต่อลิตร

3. เมื่อทำการศึกษาผลของชนิดของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตแคลเซียมมาเลตพบว่า ทั้งสองไอโซเลตมีความสามารถในการใช้กากน้ำตาลที่ผ่านการปรับสภาพเป็นแหล่งคาร์บอนได้ดีที่สุด เมื่อเทียบกับแหล่งคาร์บอนต่างๆ ที่นำมาทำการศึกษาโดยไอโซเลต AG2 สามารถผลิตแคลเซียมมาเลตได้เท่ากับ 78.08 ± 6.35 กรัมต่อลิตร และไอโซเลต NEW1 สามารถผลิตแคลเซียมมาเลตได้เท่ากับ 74.83 ± 1.47 กรัมต่อลิตร

5.2 ข้อเสนอแนะ

1.ควรศึกษาปัจจัยอื่นที่มีผลต่อการผลิตกรดมาลิคเช่น ชนิดของแหล่งไนโตรเจน และอุณหภูมิ เนื่องจากความแตกต่างของแหล่งไนโตรเจน (Zou และคณะ, 2015) และอุณหภูมิ (Ochsenreither และคณะ, 2014) อาจมีผลต่อการผลิตกรดมาลิค โดยไอโซเลต AG2 และ NEW1

2. ควรศึกษาองค์ประกอบของกากน้ำตาลด้วยการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC เพื่อจะได้ทราบองค์ประกอบของแหล่งคาร์บอนและองค์ประกอบที่จุลินทรีย์สามารถนำมาใช้ เนื่องจากกากน้ำตาลมีองค์ประกอบที่หลากหลาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

ประภัสสร เทพกัณฑ์ และ สุพรรณิกา ยอดสง่า. 2557. "การคัดแยกจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตกรดอะดิพิกจากแหล่งธรรมชาติ." โครงงานพิเศษระดับวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

พาณิภัค วารุณศาสตร์, พิมพ์พร สนเทศ, วิภาวัลย์ ชาวเมืองแมน. 2558. "การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดมาลิคจากแบคทีเรียที่คัดแยกได้." โครงงานพิเศษระดับวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

ธัมม์ทิวัตถ์ นรารัตน์วันชัย. 2555. เครื่องสำอางที่มีส่วนผสมพิเศษ. [Online]. Avaiable : http://www.mfu.ac.th/school/antiaging/admin/uploadCMS/research/4uWed125505.pdf. สืบค้นเมื่อ 25 พฤษภาคม 2560.

Abe, S., A. Furuya, T. Saito, and K. Takayama. 1962. "Method of producing L-malic acid by fermentation." U.S. patent no. 3063910. 13 November 1962.

Battat, E. Peleg, Y. Bercovitz, A. J. Rokem. JS. Goldberg, I. 1991. "Optimization of l-malic acid production by *Aspergillus flavus* in a stirred fermentor." *Biotechnology and Bioengineering*. 37(11) : 1108-1116.

Brown SH, Bashkirova L, Berka R, Chandler T, Doty T, McCall K, McCulloch M, McFarland S, Thompson S, Yaver D. 2013. "Metabolic engineering of *Aspergillus oryzae* NRRL 3488 for increased production of L-malic acid." *Applied Microbiology and Biotechnology*. 97(20) : 8903-8912.

Cao W, Luo J, Zhao J, Qiao C, Ding L, Qi B, Su Y, Wan Y. 2012. "Intensication of β-poly (L-malic acid) production by *Aureobasidium pullulans* IPE-1 in the late exponential growth phase." *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 39 : 1073-1080.

Cheng C, Zhou Y, Lin M, Wei P, Yang S.T. 2017. "Polymalic acid fermentation by *Aureobasidium pullulans* for malic acid production from soybean hull and soy molasses : Fermentation kinetics and economic analysis." *Bioresource Technology*. 223 : 166-174.

Coughlan MP, Kierstan MPJ .1998. "Preparation and applications of immobilized microorganisms a survey of recent reports." *Journal of Microbiology Methods.* 8 : 51-90.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Damalas C.A., Eleftherohorinos L.G., 2011. "Pesticide Exposure, Safety Issues, and Risk Assessment Indicators." *International Journal of Environment Resesource Public Health.* 8(5) : 1402-1419.

David L. Kirchman. 2012. "Processes in microbial ecology." United States. oxford University Press Inc., New York.

Ding Y, Li S, Dou C, Yu Y, He H. 2011. "Production of fumaric acid by *Rhizopus oryzae*: Role of carbon-nitrogen ratio." *Applied Biochemistry and Biotechnology.* 164 : 1461-1467.

Dubois M., Gilles KA., Hamilton J.K., RebersP.A., Smith F. 1956. "Colorimetric method for determination of sugars and related substances." *Analytical Chemistry.* 28(3) : 350-356.

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

Geiser, E. Wiebach, V. Wierckx, N. Blank, L. M. 2014. "Prospecting the biodiversity of the fungal family *Ustilaginaceae* for the production of top value-added chemicals." *Fungal Biology and Biotechnology.* 1(2) : 1-10.

Goldberg, I. Rokem, JS. Pines, O. 2006. "Organic acids: Old metabolites, new themes." *Journal of Chemical Technology and Biotechnology.* 2006 81(10) : 1601-1611.

Hronská, H. Tokošová, S. Pilniková, A. Krištofíková, L. Rosenberg, M. 2015. "Bioconversion of fumaric acid to L-malic acid by the bacteria of the genus *Nocardia.*" *Applied Biochemical and Biotechnology.* 175 : 266-273.

Hsiao, Y. P. Lai, W. W. Wu, S. B. Tsai, C. H. Tang, s. c. Chung, J. G. Yang, J. H. 2015. "Triggering apoptotic death of human epidermal keratinocytes by malic acid: Involvement of endoplasmic reticulum stress-and mitochondria dependent signaling pathways." *Toxins.* 7(1) : 81-96.

Huanga ZW., Laurent V, Chetouania G, Ljubimovac JY, Holler E. 2012. "New functional degradable and bio-compatible nanoparticles based on poly (malic acid) derivatives for site-specific anti-cancer drug delivery." *International Journal of Pharmaceutics.* 423(1) : 84-92.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Jeon, J. M. Rajesh, T. Song, E. Lee, H. W. Yang, Y. H. 2013. "Media optimization of *Corynebacterium glutamicum* for succinate production under oxygendeprived condition." *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 23(2) : 211-217.

Jiang, L. Wang, J. Liang, S. Li, S. Cai, J. Xu, Z. Cen, P. Yang, S. 2010. "Enhanced butyric acid tolerance and bioproduction by *Clostridium tyrobutyricum* immobilized in a fibrous bed bioreactor." *Biotechnology and Bioengineering.* 108 : 31-40.

Kautola H, Vahvaselka M, Linko Y.Y, Linko P. 1985. "Itaconic acid production by immobilized *Aspergillus terreus* from xylose and glucose." *Biotechnology Letters.* 7 : 167-172.

Kawagoe M., Hyakumura S.I., Suye K., Miki, K. Naoe. 1997. "Application of bubble column fermentors to submerged culture of *Schizophyllum commune* for production of L-malic acid." *Journal of Fermentation Bioengineering*. 84(3) : 33-336.

Keeney D.R., Bremner J.M. 1966. "Comparison and evaluation of laboratory methods of obtaining an index of soil nitrogen availability." *Agronomy Journal*. 58 : 498.

Khan, Nazir I., Wang K., Liu Z.P., Chi G.L. 2014. "Calcium malate overproduction by *Penicillium viticola* 152 using the medium containing corn steep liquor." *Applied Microbiology and Biotechnology* 98 : 1539-1546.

Klement, T. Büchs, J. 2013. "Itaconic acid: A biotechnological process in change." *Bioresource Technology*. 135 : 422-431.

Knuf, C. 2014. "Malic acid production by *Aspergillus oryzae*." Ph.D. Thesis of Philosophy, Chalmers University of Technology.

Knuf, C. Nookaew, I. Brown, S. H. McCulloch, 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.

Ladisch M.R., Lin K.W., Voloch M., Tsao G.T. 1983. "Process considerations in the enzymatic hydrolysis of biomass." *Enzyme Microbial Technology.* 5 : 82-102.

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. Jiang, S. 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.

Liggett R.W., Koffler H. 1948. "Corn steep liquor in microbiology." *Bacteriol reviews.* 12(4) : 291-311.

Lumyong, S., Tomita F. 1991. "L-malic acid production by an albino strain of *Monascus araneosus*." *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 9(3) : 383-384.

Magnuson J.K., Lasure L.L. 2004. "Organic acid production by filamentous fungi." *Advances in Fungal Biotechnology for Industry, Agriculture, and Medicine.* 12 : 307-340.

Maas RHW, Bakker RR, Eggink G, Weusthuis RA. 2006. Lactic acid production from xylose by the fungus *Rhizopus oryzae. Applied Microbiology and Biotechnology* 72 : 861-868

Michal, G. and Schomburg, D. 2012. **Biochemical Pathways An Atlas of Biochemistry and Molecular Biology.** 2nd ed. New Jersey : John Wiley and Sons.

Mickelson M.N. 1972. "Glucose degradation, molar growth yields, and evidence for oxidative phosphorylation in *Streptococcus agalactiae.*" *Jounal of Bacteriology*. 109(1) : 96-105.

Miller GL. 1959. "Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing Sugar." *Analytical Chemistry*. 31(3) : 426-428.

Müller MM, Kügler JH, Henkel M, Gerlitzki M, Hörmann B, Pöhnlein M, Syldatk C, Hausmann R. 2012. "Rhamnolipids-next generation biosurfactants." *Journal of Biotechnology.* 162 : 366-380.

Mu L, Wen J. 2013. "Engineered *Bacillus subtilis* 168 produces L-malate by heterologous biosynthesis pathway construction and lactate dehydrogenase deletion." *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 29 : 33-41.

Nelson D.L.,Cox M. 2012. **Principles of Biochemistry**. 6th ed. Washington DC : Freeman & Company.

Neufeld, R. J. Peleg, Y. Rokem, J. S. Pinest, O. Goldberg, I. 1991. "L-Malic acid formation by immobilized *Saccharomyces cerevisiae* amplified for fumarase" *Enzyme Microbial Technology*. 13(12) : 991-996.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Nordell, B. 2003. "Thermal pollution causes global warming." *Global and Planetary Change* 38 : 305-312.

Ochsenreither, K. Fischer, C. Neumann, A. Syldatk, C. 2014. "Process characterization and influence of alternative carbon sources and carbon-to-nitrogen ratio on organic acid production by *Aspergillus oryzae* DSM1863." *Applied Microbiology and Biotechnology.* 98 : 5449-5460.

Olbrich H. 1963. **The molasses**. 1st ed. Germany. Insititute of Zuckerindustrie.

Peleg, Y. Rahamin, E. Kessel, M. Goldberg, I. 1988. "Malic acid accumulation by *Aspergillus flavus*." *Applied Microbiology and Biotechnology.* 30 : 176-183.

Presecki A.V., Bruno Zelic, Durda VasicRacki. 2007. "Comparison of the l-malic acid production by isolated fumarase and fumarase in permeabilized baker's yeast cells." *Enzyme and Microbial Technology.* 41 : 605-612.

Rhodes R. A., Mayer A. J., Smith M.L., Kelley S.E. 1959. "Production of fumaric acid by *Rhizopus arrhizus." Applied Microbiology.* 7(2) : 74-80.

Roukas, T. 1998. "Pretreatment of beet molasses to increase pullulan production." *Process Biochemistry.* 33 : 805-810.

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

Sharma, N. Prasad, GS. Choudhury, AR. 2013. "Utilization of corn steep liquor for biosynthesis of pullulan an important exopolysaccharide." *Carbohydrate Polymers.* 93 : 95-101.

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

Stojkovic G, Plazl PZ. 2012. "Continuous synthesis of l-malic acid using whole-cell microreactor." *Process Biochemistry.* 47 : 1102-1107.

Suwannakham, S. and Yang, S. T. 2005. "Enhanced propionic acid fermentation by *Propionibacterium acidipropionici* mutant obtained by adaptation in a fibrous-bed bioreactor." *Biotechnology and bioengineering*. 91 : 325-337.

Taing, O. and Taing, K. 2007. "Production of malic and succinic acids by sugar-tolerant yeast *Zygosaccharomyces rouxii*." *European Food Research and Technology*. 224 : 343-347.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Tabuchi, T. Sugisawa, T. Ishidori, T. Nakahara, T. Sugiyama, J. 1981. "Itaconic acid fermentation by a yeast belonging to the genus *Candida*." *Agricultural and Biological Chemistry*. 45(2) : 475-479.

Vuoristo K.S., Mars A.E., Sangra J.V., Springer J., Eggink G. Sanders J.P.M., Weusthuis R.A. 2015. "Metabolic engineering of the mixed-acid fermentation pathway of *Escherichia coli* for anaerobic production of glutamate and itaconate." *AMB Express*. 5 : 61-71.

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

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

Werpy, T. Petersen, GR. Aden, A. Bozell, JJ. Holladay, J. White, J. Manheim, A Eliot, D. Lasure, L. Jones, S. 2004. "Top value added chemicals from biomass." *Volume 1 results of screening for potential candidates from sugars and synthesis gas.*

Wu, Z. T., Yang, S. T. 2003. "Extractive fermentation for butyric acid production from glucose by *Clostridium tyrobutyricum*." *Biotechnology and Bioengineering*. 82 : 93-102.

Yang ST, Shu CH. 1996. "Kinetics and stability of GM–CSF production by recombinant yeast cells immobilized in a fibrous-bed bioreactor." *Biotechnology Progress*. 12 : 449-456.

Ye X., Honda K., Morimoto Y., Okano K., Ohtake H. 2013. "Direct conversion of glucose to malate by synthetic metabolic engineering." *Journal of Biotechnology*. 164 : 34-40.

Yonghong, H.,Pingkai O. 2010. "L-Malic acid production by fumarase." *Encyclopedia of Industrial Biotechnology*. 7 : 1-14.

Yoshikawa J., Amachi S., Shinoyama H., Fujii T. 2006. Multiple beta-fructofuranosidases by *Aureobasidium pullulans* DSM2404 and their roles in fructooligosaccharide production. *FEMS Microbiology Letters*. 65 : 159-163.

Zambanini T, Sarikaya E, Kleineberg W, Buescher JM, Meurer G, Wierckx N, Lars M. 2016. "Efficient malic acid production from glycerol with *Ustilago trichophora* TZ1." *Biotechnology Biofuels*. 9(67) : 1-8.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Zambanini T, Sarikaya T, Kleineberg W, Buescher JM, Meurer G, Wierckx N. Lars M. 2017. "Enhanced malic acid production from glycerol with high-cell density *Ustilago trichophora* TZ1 cultivations." *Biotechnology Biofuels.* 9(135) : 1-10.

Zou X, Zhou Y, Tian SY. 2013. "Production of polymalic acid and malic acid by *Aureobasidium pullulans* fermentation and acid hydrolysis" *Biotechnology and Bioengineering.* 110(8) : 2105-2113.

Zou X, Wang Y, Tu G, Zan Z, Wu X. 2015. "Adaption and transcriptome analysis of *Aureubasidium pullulans* in corncob hydrolysate for increase inhibitor tolerance to malic acid production." *PLOS ONE.* 10(3) : 1-17.

Zou X, Yanga J, Tiana X, Guoc M, Li Z, Yunzheng. 2016. "L- Production of polymalic acid and malic acid from xylose and corncob hydrolysate by a novel *Aureobasidium pullulans* YJ 6–11 strain" *Process Biochemistry.* 51 : 16-23.

Zelle RM, de Hulster E, van Winden WA. 2008. "Malic acid production by *Saccharomyces cerevisiae*: engineering of pyruvate carboxylation, oxaloacetate reduction, and malate export." *Applied Environment Microbiology*. 74 : 2766-2777.

Zelle RM, de Hulster E, Kloezen W. 2010. "Key process conditions for production of C4 dicarboxylic acids in bioreactor batch cultures of an engineered *Saccharomyces cerevisiae* strain." *Applied Environment Microbiology*. 76 : 744-750.

Zhang H, Cai H, Dong J,. 2011a. "High-level production of poly (β-L-malic acid) with a new isolated *Aureobasidium p ullulans* strain." *Applied Environment Microbiology*. 92 : 295-303.

Zhang X, Wang X, Shanmugam KT, Ingram LO. 2011b. "L-Malate production by metabolically engineered *Escherichia coli*." *Applied Environment Microbiology*. 77 : 427-434.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. สูตรอาหารสำหรับการตรวจสอบจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้

1.1 สูตรอาหารแข็ง Selective medium (Tabushi และคณะ, 1981)

Glucose	100	กรัมต่อลิตร
Yeast extract	5	กรัมต่อลิตร
KH_2PO_4	1.0	กรัมต่อลิตร
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.5	กรัมต่อลิตร
$CaCO_3$	10.0	กรัมต่อลิตร
Agar	20.0	กรัมต่อลิตร

2. สูตรอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อศึกษาผลของอาหาร

2.1 อาหารสูตร Shaker culture (Tabushi และคณะ, 1981)

Glucose	100	กรัมต่อลิตร
NH_4Cl	3.0	กรัมต่อลิตร
KH_2PO_4	0.5	กรัมต่อลิตร
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.5	กรัมต่อลิตร
Yeast extract	1.0	กรัมต่อลิตร
$CaCO_3$	30.0	กรัมต่อลิตร

2.2 อาหารสูตร Main culture (Ochsenreither และคณะ, 2014)

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.1	กรัมต่อลิตร
NaCl	5.0	กรัมต่อลิตร
$CaCO_3$	30	กรัมต่อลิตร

2.3 อาหารสูตร Calcium malate production (Khan และคณะ, 2014)

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

2.4 อาหารสูตร Production medium (Zhang และคณะ, 2011a)

Glucose	100	กรัมต่อลิตร
KH_2PO_4	0.1	กรัมต่อลิตร
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.1	กรัมต่อลิตร
KCl	0.5	กรัมต่อลิตร
$NaNO_3$	2.0	กรัมต่อลิตร
$CaCO_3$	3.0	กรัมต่อลิตร

2.5 อาหารสูตร Basic medium (Li และคณะ, 2014)

Glucose	100	กรัมต่อลิตร
KH_2PO_4	0.8	กรัมต่อลิตร
$(NH_4)_2SO_4$	2.0	กรัมต่อลิตร
$MgSO_4$	0.3	กรัมต่อลิตร
$ZnSO_4$	0.2	กรัมต่อลิตร
$CaCO_3$	30	กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน

1.อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C:N ratio)

1.1 อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนของอาหารสูตร Basic medium

C:N ratio	$(NH_4)_2SO_4$ (กรัม)
50:1	4
75:1	2.7
100:1	2.0
125:1	1.6
150:1	1.3
200:1	1

2.2 อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนของอาหารสูตร Calcium malate production

C:N Ratio	Corn steep liquor (มิลลิลิตร)
10:1	13.9
20:1	7.2
30:1	5.0
40:1	3.9
50:1	3.2
100:1	1.9

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

การเตรียมสารละลายกลูโคสมาตรฐาน

การเตรียมสารละลายดีเอนเอส

การเตรียมสารละลายฟีนอลซัลฟูริค

1. การเตรียมสารละลายกลูโคสมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธีดีเอนเอส (DNS method)

ทำการอบกลูโคสที่ปราศจากน้ำในตู้อบอุณหภูมิ 60 ถึง 70 องศาเซลเซียส จากนั้นทิ้งให้เย็นในเดซิเคเตอร์เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นชั่งน้ำหนักกลูโคสที่เตรียมได้ 0.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลายกลูโคสมาตรฐานความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นทำการเจือจางสารละลายกลูโคสมาตรฐานที่ได้โดยใช้น้ำกลั่น ดังตารางที่ ค1

ตารางที่ ค1 การเจือจางสารละลายกลูโคสมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้นกลูโคสมาตรฐาน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	สารละลายกลูโคสมาตรฐาน (มิลลิลิตร)	น้ำกลั่น (มิลลิลิตร)
0	0.0	5.0
200	1.0	4.0
400	2.0	3.0
600	3.0	2.0
800	4.0	1.0
1000	5.0	0.0

จากนั้นทำการเตรียมกราฟมาตรฐานกลูโคส โดยนำสารละลายกลูโคสที่ความเข้มข้นต่างๆที่เตรียมไว้ และทำการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธีดีเอนเอส โดยใช้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. การเตรียมสารละลายดีเอนเอส

ชั่งสาร 3,5-ไดไนโตรซาลิไซลิค 10 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 250 มิลลิลิตร เติมสารละลายด่างทีละน้อย (โซเดียมไฮดรอกไซด์ 2 โมลาร์ : ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 16 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร) จากนั้นคนสารละลายทั้งสองให้เข้ากัน ทำการเติมโพแทสเซียมทาร์เทรตลงไปทีละน้อย พร้อมกับคนให้เข้ากันจนครบ 300 กรัม และปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 1000 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น เก็บสารละลายที่เตรียมได้กรองผ่านกระดาษกรองแล้วเก็บไว้ในขวดสีชา

3. การเตรียมสารละลายกลูโคสมาตรฐานสำหรับวัดปริมาณน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธีฟีนอลซัลฟูริค

ชั่งสารละลายกลูโคส 0.1 กรัม เติมน้ำกลั่นปรับปริมาตรด้วยขวดปรับปริมาตร 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลายกลูโคสที่มีความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

เตรียมสารละลายกลูโคสความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยปิเปตสารละลายเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากนั้นเจือจางสารละลายกลูโคสให้อยู่ในช่วงความเข้มข้น 0 20 40 60 80 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ดังตาราง ค2

ตาราง ค2 การเจือจางสารละลายกลูโคสที่ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้นสารละลายกูลโคสมาตรฐาน (ไมโครกรัมต่อมิลลลิตร) (มิลลิลิตร)	สารละลายกลูโคสมาตรฐาน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) (มิลลิลิตร)	ปริมาตรน้ำกลั่น (มิลลิลิตร)
0	0	5.0
20	1.0	4.0
40	2.0	3.0
60	3.0	2.0
80	4.0	1.0
100	5.0	0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นำสารละลายกลูโคสที่ความเข้มข้น 0 20 40 60 80 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เตรียมได้จากตาราง ค2 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และเติมฟีนอลความเข้มข้นร้อยละ 5 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง จากนั้นเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้นปริมาตร 5 มิลลิลิตรลงไปอย่างรวดเร็ว ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 10 นาทีในตู้ดูดควัน นำสารละลายที่ได้มาเขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10-20 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค3 แสดงปริมาณกลูโคสที่เหลือของไอโซเลต AG2 เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหารชนิดต่างๆ

ไอโซเลต	condition	วลา (วัน	ารเจือจา	OD 540			กลูโคสที่เหลืออยู่							กลูโคสที่ถูกใช้		แคลเซียมมาเลตที่ผลิตได้			แคลเซียมมา	แคลเซียมม	ผลได้			อัตราการผลิต
				1	2	3	1	2	3	มโครกรัมต่อมิลลิลิตร	กรัมต่อลิตร	SD	RS ± RD	กรัมต่อลิตร	โมล	กรัมต่อลิตร	SD	MA ± SD	โมล	โมล	โมลต่อโมล	SD	Y ± SD	กรัมต่อลิตร.ชั่วโมง
AG 2	สูตร C shaker culture	0	100	0.737	0.740	0.734	105285.71	105714.29	104857.14	105285.71	105.29	0.35	105.29 ± 0.35	0.00	0.00	16.78	0.06	16.78± 0.06	0.10	1.09	0.18	0.00	0.18 ± 0.00	0.14
		1	100	0.606	0.621	0.611	86571.43	88714.29	87285.71	87523.81	87.52	0.89	87.52 ± 0.89	17.76	0.10									
		2	50	0.708	0.701	0.700	50571.43	50071.43	50000.00	50214.29	50.21	0.25	50.21 ±0.25	55.07	0.31									
		3	50	0.457	0.460	0.481	32642.86	32857.14	34357.14	33285.71	33.29	0.76	33.29 ± 0.76	72.00	0.40									
		4	50	0.411	0.403	0.407	29357.14	28785.71	29071.43	29071.43	29.07	0.23	29.07 ± 0.23	76.21	0.42									
		5	20	0.264	0.260	0.274	7542.86	7428.57	7828.57	7600.00	7.60	0.17	7.60 ± 0.17	97.69	0.54									
	สูตร 1 main culture	0	100	0.766	0.763	0.769	109428.57	109000.00	109857.14	109428.57	109.43	0.35	109.43 ± 0.35	0.00	0.00	44.88	0.14	44.88 ± 0.14	0.26	1.11	0.47	0.00	0.47 ± 0.00	0.37
		1	100	0.611	0.614	0.61	87285.71	87714.29	87142.86	87380.95	87.38	0.24	87.38 ± 0.24	22.05	0.12									
		2	50	0.363	0.36	0.329	25928.57	25714.29	23500.00	25047.62	25.05	1.10	25.05 ± 1.10	84.38	0.47									
		3	20	0.426	0.416	0.411	12171.43	11885.71	11742.86	11933.33	11.93	0.18	11.93 ± 0.18	97.50	0.54									
		4	20	0.342	0.329	0.368	9771.43	9400.00	10514.29	9895.24	9.90	0.46	9.90 ± 0.46	99.53	0.55									
		5	20	0.306	0.339	0.341	8742.86	9685.71	9742.86	9390.48	9.39	0.46	9.39 ± 0.46	100.04	0.56									
	สูตร 2 calcium culture	0	100	0.811	0.809	0.801	115857.14	115571.43	114428.57	115285.71	115.29	0.62	115.29 ± 0.62	0.00	0.00	47.78	0.26	47.78 ± 0.26	0.28	1.04	0.53	0.00	0.53 ± 0.00	0.40
		1	100	0.671	0.667	0.673	95857.14	95285.71	96142.86	95761.90	95.76	0.36	95.76 ± 0.36	19.52	0.11									
		2	50	0.408	0.401	0.403	29142.86	28642.86	28785.71	28857.14	28.86	0.21	28.86 ± 0.21	86.43	0.48									
		3	50	0.399	0.392	0.391	28500.00	28000.00	27928.57	28142.86	28.14	0.25	28.14 ± 0.25	87.14	0.48									
		4	50	0.335	0.321	0.337	23928.57	22928.57	24071.43	23642.86	23.64	0.51	23.64 ± 0.51	91.64	0.51									
		5	50	0.298	0.296	0.299	21285.71	21142.86	21357.14	21261.90	21.26	0.09	21.26 ± 0.09	94.02	0.52									
	สูตร 3 production medium	0	100	0.743	0.766	0.751	106142.86	109428.57	107285.71	107619.05	107.62	1.36	107.62 ± 1.36	0.00	0.00	39.16	0.50	39.16 ± 0.50	0.23	1.00	0.45	0.01	0.45 ± 0.01	0.33
		1	100	0.621	0.626	0.631	88714.29	89428.57	90142.86	89428.57	89.43	0.58	89.43 ± 0.58	18.19	0.10									
		2	50	0.539	0.539	0.543	38500.00	38500.00	38785.71	38595.24	38.60	0.13	38.60 ± 0.13	69.02	0.38									
		3	20	0.673	0.672	0.670	19228.57	19200.00	19142.86	19190.48	19.19	0.04	19.19 ± 0.04	88.43	0.49									
		4	20	0.670	0.641	0.642	19142.86	18314.29	18342.86	18600.00	18.60	0.38	18.60 ± 0.38	89.02	0.49									
		5	20	0.600	0.602	0.604	17142.86	17200.00	17257.14	17200.00	17.20	0.05	17.20 ± 0.05	90.42	0.50									
	สูตร 4 basic medium	0	100	0.714	0.711	0.712	102000.00	101571.43	101714.29	101761.90	101.76	0.18	101.76 ± 0.18	0.00	0.00	65.21	0.11	65.24 ± 0.11	0.38	1.07	0.71	0.00	0.71 ± 0.00	0.54
		1	50	0.578	0.571	0.58	41285.71	40785.71	41428.57	41166.67	41.17	0.28	34.02 ±0.28	60.60	0.34									
		2	50	0.311	0.309	0.316	22214.29	22071.43	22571.43	22285.71	22.29	0.21	29.83 ±0.15	79.48	0.44									
		3	20	0.222	0.231	0.236	6342.86	6600.00	6742.86	6561.90	6.56	0.17	6.56 ± 0.17	95.20	0.53									
		4	20	0.208	0.207	0.203	5942.86	5914.29	5800.00	5885.71	5.89	0.06	5.89 ± 0.06	95.88	0.53									
		5	20	0.201	0.2	0.206	5742.86	5714.29	5885.71	5780.95	5.78	0.07	5.78 ± 0.07	95.98	0.53									

ตารางที่ ค4 แสดงปริมาณกลูโคสที่เหลือของไอโซเลต NEW1 เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหารชนิดต่างๆ

ไอโซเลต	condition	วลา (วัน	การเจือจา	OD 540			กลูโคสที่เหลืออยู่							กลูโคสที่ถูกใช้		แคลเซียมมาเลตที่ผลิตได้			แคลเซียมมาเ	แคลเซียมม	ผลได้			อัตราการผลิต
				1	2	3	1	2	3	มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	กรัมต่อลิตร	SD	RS ± RD	กรัมต่อลิตร	โมล	กรัมต่อลิตร	SD	MA ± SD	โมล	โมล	โมลต่อโมล	SD	Y ± SD	กรัมต่อลิตร.ชั่วโมง
NEW	สูตร C shaker culture	0	50	0.73	0.765	0.801	91250.00	95625.00	100125.00	95666.67	95.67	3.62	95.67 ± 3.62	0.00	0.00	2.92	0.11	2.92 ± 0.11	0.02	0.98	0.03	0.00	0.03 ± 0.00	0.02
		1	50	0.677	0.688	0.717	84625.00	86000.00	89625.00	86750.00	86.75	2.11	86.75 ± 2.11	8.92	0.05									
		2	50	0.48	0.483	0.489	60000.00	60375.00	61125.00	60500.00	60.50	0.47	60.50 ± 0.47	35.17	0.20									
		3	20	0.316	0.32	0.315	15800.00	16000.00	15750.00	15850.00	15.85	0.11	15.85 ± 0.11	79.82	0.44									
		4	10	0.326	0.32	0.315	8150.00	8000.00	7875.00	8008.33	8.01	0.11	8.01 ± 0.11	87.66	0.49									
		5	10	0.267	0.29	0.293	6675.00	7250.00	7325.00	7083.33	7.08	0.29	7.08 ± 0.29	88.58	0.49									
	สูตร 1 main culture	0	50	0.789	0.790	0.784	98625.00	98750.00	98000.00	98458.33	98.46	0.33	77.88 ± 1.58	0.00	0.00	49.29	0.16	49.29 ± 0.16	0.29	0.95	0.60	0.00	0.60 ± 0.00	0.41
		1	50	0.559	0.540	0.505	69875.00	67500.00	63125.00	66833.33	66.83	2.80	66.83 ± 2.80	31.63	0.18									
		2	50	0.261	0.262	0.266	32625.00	32750.00	33250.00	32875.00	32.88	0.27	32.88 ± 0.27	65.58	0.36									
		3	20	0.394	0.400	0.411	19700.00	20000.00	20550.00	20083.33	20.08	0.35	20.08 ± 0.35	78.38	0.44									
		4	20	0.273	0.250	0.261	13650.00	12500.00	13050.00	13066.67	13.07	0.47	13.07 ± 0.47	85.39	0.47									
		5	20	0.255	0.267	0.259	12750.00	13350.00	12950.00	13016.67	13.02	0.25	13.60 ± 0.66	85.44	0.47									
	สูตร 2 calcium culture	0	100	0.732	0.74	0.738	104571.43	105714.29	105428.57	105238.10	105.24	0.49	122.24 ± 0.41	0.00	0.00	56.62	0.26	56.62 ± 0.26	0.33	1.10	0.60	0.00	0.60 ± 0.00	0.47
		1	100	0.619	0.611	0.617	88428.57	87285.71	88142.86	87952.38	87.95	0.49	109.10 ± 0.41	17.29	0.10									
		2	50	0.408	0.44	0.421	29142.86	31428.57	30071.43	30214.29	30.21	0.94	30.21 ± 0.94	75.02	0.42									
		3	20	0.31	0.316	0.319	8857.14	9028.57	9114.29	9000.00	9.00	0.11	9.00 ± 0.11	96.24	0.53									
		4	20	0.214	0.221	0.219	6114.29	6314.29	6257.14	6228.57	6.23	0.08	6.23 ± 0.08	99.01	0.55									
		5	20	0.209	0.207	0.203	5971.43	5914.29	5800.00	5895.24	5.90	0.07	5.90 ± 0.07	99.34	0.55									
	สูตร 3 production medium	0	50	0.773	0.777	0.775	96625.00	97125.00	96875.00	96875.00	96.88	0.20	96.88 ± 0.20	0.00	0.00	44.72	0.09	44.73 ± 0.09	0.26	0.87	0.60	0.00	0.60 ± 0.00	0.37
		1	50	0.452	0.471	0.461	56500.00	58875.00	57625.00	57666.67	57.67	0.97	57.67 ± 0.97	39.21	0.22									
		2	20	0.471	0.425	0.452	23550.00	21250.00	22600.00	22466.67	22.47	0.94	22.47 ± 0.94	74.41	0.41									
		3	20	0.354	0.367	0.365	17700.00	18350.00	18250.00	18100.00	18.10	0.29	18.10 ± 0.29	78.78	0.44									
		4	20	0.341	0.359	0.353	17050.00	17950.00	17650.00	17550.00	17.55	0.37	17.55 ± 0.37	79.33	0.44									
		5	20	0.376	0.354	0.395	18800.00	17700.00	19750.00	18750.00	18.75	0.84	18.75 ± 0.84	78.13	0.43									
	สูตร 4 basic medium	0	50	0.774	0.780	0.779	96750.00	97500.00	97375.00	97208.33	97.21	0.33	83.51 ± 1.55	0.00	0.00	48.62	0.16	48.62± 0.16	0.28	1.01	0.56	0.00	0.56 ± 0.00	0.41
		1	50	0.564	0.560	0.573	70500.00	70000.00	71625.00	70708.33	70.71	0.68	70.71 ± 0.68	26.50	0.15									
		2	50	0.234	0.288	0.248	29250.00	36000.00	31000.00	32083.33	32.08	2.86	32.08 ± 2.86	65.13	0.36									
		3	20	0.389	0.390	0.399	19450.00	19500.00	19950.00	19633.33	19.63	0.22	19.63 ± 0.22	77.58	0.43									
		4	10	0.415	0.367	0.423	10375.00	9175.00	10575.00	10041.67	10.04	0.62	10.04 ± 0.62	87.17	0.48									
		5	10	0.260	0.244	0.271	6500.00	6100.00	6775.00	6458.33	6.46	0.28	6.46 ± 0.28	90.75	0.50									

ตารางที่ ค5 แสดงปริมาณกลูโคสที่เหลือของไอโซเลต AG2 เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหาร basic medium ที่มีอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่างๆ

ไอโซเลต	condition	เวลา (วัน)	การเจือจาง	OD 540			กลูโคสที่เหลืออยู่							กลูโคสที่ถูกใช้		แคลเซียมมาเลตที่ผลิตได้			แคลเซียมมาเลตที่ผ่	ยมมาเลตตาม	ผลได้			อัตราการผลิต
				1	2	3	1	2	3	ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	กรัมต่อลิตร	SD	RS ± RD	กรัมต่อลิตร	โมล	กรัมต่อลิตร	SD	MA ± SD	โมล	โมล	โมลต่อโมล	SD	Y ± SD	กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง
AG 2	50 : 1	0	100	0.730	0.734	0.731	104285.71	104857.14	104428.57	104523.81	104.52	0.24	4.52 ± 0.24	0.00	0.00	58.17	0.14	58.17 ± 0.14	0.34	0.83	0.81	0.01	0.81 ± 0.01	0.48
		1	100	0.656	0.653	0.657	93714.29	93285.71	93857.14	93619.05	93.62	0.24	93.62 ± 0.24	10.90	0.06									
		2	50	0.479	0.485	0.480	34214.29	34642.86	34285.71	34380.95	34.38	0.19	34.38 ± 0.19	70.14	0.39									
		3	50	0.461	0.464	0.460	32928.57	33142.86	32857.14	32976.19	32.98	0.12	32.98 ± 0.12	71.55	0.40									
		4	50	0.460	0.457	0.451	32857.14	32642.86	32214.29	32571.43	32.57	0.27	32.57 ± 0.27	71.95	0.40									
		5	50	0.410	0.415	0.419	29285.71	29642.86	29928.57	29619.05	29.62	0.26	29.62 ± 0.26	74.90	0.42									
	75 : 1	0	100	0.762	0.768	0.769	108857.14	109714.29	109857.14	109476.19	109.48	0.44	109.48 ± 0.44	0.00	0.00	49.82	0.20	49.82 ± 0.20	0.29	1.05	0.55	0.00	0.55 ± 0.00	0.42
		1	100	0.639	0.64	0.644	91285.71	91428.57	92000.00	91571.43	91.57	0.31	91.57 ± 0.31	17.90	0.10									
		2	50	0.572	0.581	0.577	40857.14	41500.00	41214.29	41190.48	41.19	0.26	41.19 ± 0.26	68.29	0.38									
		3	50	0.532	0.529	0.524	38000.00	37785.71	37428.57	37738.10	37.74	0.24	37.74 ± 0.24	71.74	0.40									
		4	20	0.514	0.510	0.516	14685.71	14571.43	14742.86	14666.67	14.67	0.07	14.67 ± 0.07	94.81	0.53									
		5	20	0.510	0.512	0.509	14571.43	14628.57	14542.86	14580.95	14.58	0.04	14.58 ± 0.04	94.90	0.53									
	100 :1	0	100	0.754	0.759	0.752	107714.29	108428.57	107428.57	107857.14	107.86	0.42	107.86 ± 0.42	0.00	0.00	49.17	0.19	49.17 ± 0.19	0.29	1.13	0.51	0.00	0.51 ± 0.00	0.41
		1	100	0.592	0.591	0.595	84571.43	84428.57	85000.00	84666.67	84.67	0.24	84.67 ± 0.24	23.19	0.13									
		2	50	0.354	0.361	0.358	25285.71	25785.71	25571.43	25547.62	25.55	0.20	25.55 ± 0.20	82.31	0.46									
		3	20	0.277	0.273	0.278	7914.29	7800.00	7942.86	7885.71	7.89	0.06	7.80 ± 0.06	99.97	0.56									
		4	20	0.230	0.236	0.238	6571.43	6742.86	6800.00	6704.76	6.70	0.10	6.70 ± 0.10	101.15	0.56									
		5	20	0.21	0.224	0.219	6000.00	6400.00	6257.14	6219.05	6.22	0.17	6.22 ± 0.17	101.64	0.56									
	125 : 1	0	100	0.750	0.753	0.752	107142.86	107571.43	107428.57	107380.95	107.38	0.18	107.38 ± 0.18	0.00	0.00	47.58	0.08	47.58 ± 0.08	0.28	1.16	0.48	0.00	0.48 ± 0.00	0.40
		1	100	0.632	0.640	0.638	90285.71	91428.57	91142.86	90952.38	90.95	0.49	90.95 ± 0.49	16.43	0.09									
		2	50	0.521	0.519	0.513	37214.29	37071.43	36642.86	36976.19	36.98	0.24	36.98 ± 0.24	70.40	0.39									
		3	20	0.467	0.462	0.470	13342.86	13200.00	13428.57	13323.81	13.32	0.09	13.32 ± 0.09	94.06	0.52									
		4	10	0.292	0.299	0.296	4171.43	4271.43	4228.57	4223.81	4.22	0.04	4.22 ± 0.04	103.16	0.57									
		5	10	0.232	0.241	0.238	3314.29	3442.86	3400.00	3385.71	3.39	0.05	3.39 ± 0.05	104.00	0.58									
	150 : 1	0	100	0.778	0.772	0.770	111142.86	110285.71	110000.00	110476.19	110.48	0.49	110.48 ± 0.49	0.00	0.00	49.38	0.22	49.38 ± 0.22	0.29	1.10	0.52	0.00	0.52 ± 0.00	0.41
		1	100	0.356	0.349	0.353	50857.14	49857.14	50428.57	50380.95	50.38	0.41	50.38 ± 0.41	60.10	0.33									
		2	20	0.586	0.580	0.588	16742.86	16571.43	16800.00	16704.76	16.70	0.10	16.70 ± 0.10	93.77	0.52									
		3	20	0.495	0.493	0.499	14142.86	14085.71	14257.14	14161.90	14.16	0.07	14.16 ± 0.07	96.31	0.54									
		4	20	0.470	0.477	0.474	13428.57	13628.57	13542.86	13533.33	13.53	0.08	13.53 ± 0.08	96.94	0.54									
		5	20	0.410	0.422	0.419	11714.29	12057.14	11971.43	11914.29	11.91	0.15	11.91 ± 0.15	98.56	0.55									
	200 : 1	0	100	0.788	0.782	0.781	112571.43	111714.29	111571.43	111952.38	111.95	0.44	111.05 ± 0.44	0.00	0.00	44.69	0.18	44.69 ± 0.18	0.26	1.12	0.46	0.00	0.46 ± 0.00	0.37
		1	100	0.699	0.692	0.696	99857.14	98857.14	99428.57	99380.95	99.38	0.41	99.38 ± 0.41	12.57	0.07									
		2	50	0.536	0.544	0.540	38285.71	38857.14	38571.43	38571.43	38.57	0.23	38.57 ± 0.23	73.38	0.41									
		3	50	0.462	0.464	0.470	33000.00	33142.86	33571.43	33238.10	33.24	0.24	33.24 ± 0.24	78.71	0.44									
		4	20	0.411	0.416	0.414	11742.86	11885.71	11828.57	11819.05	11.82	0.06	11.82 ± 0.06	100.13	0.56									
		5	20	0.392	0.394	0.393	11200.00	11257.14	11228.57	11228.57	11.23	0.02	11.23 ± 0.02	100.72	0.56									

ตารางที่ ค6 แสดงปริมาณกลูโคสที่เหลือของไอโซเลต NEW1 เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหาร calcium malate production ที่มีอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่างๆ

ไอโซเลต	condition	เวลา (วัน)	การเจือจาง	OD 540			กลูโคสที่เหลืออยู่							กลูโคสที่ถูกใช้		แคลเซียมมาเลตที่ผลิตได้			แคลเซียมมาเลตที่เหลือจากปฏิ	แคลเซียมมาเลตตาม	ผลได้			อัตราการผลิต
				1	2	3	1	2	3	ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	กรัมต่อลิตร	SD	RS ± RD	กรัมต่อลิตร	โมล	กรัมต่อลิตร	SD	MA ± SD	โมล	โมล	โมลต่อโมล	SD	Y ± SD	กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง
NEW	10 : 1	0	100	0.875	0.885	0.881	125000.00	126428.57	125857.14	125761.90	125.76	0.59	125.76 ± 0.59	0.00	0.00									
		1	100	0.395	0.450	0.413	56428.57	64285.71	59000.00	59904.76	59.90	3.27	59.90 ± 3.27	65.86	0.37									
		2	50	0.571	0.574	0.546	40785.71	41000.00	39000.00	40261.90	40.26	0.90	40.26 ± 0.90	85.50	0.48	41.45	0.19	41.45 ± 0.19	0.24	1.36	0.36	0.00	0.36 ± 0.00	0.43
		3	10	0.385	0.379	0.373	5500.00	5414.29	5328.57	5414.29	5.41	0.07	5.41 ± 0.07	120.35	0.67									
		4	10	0.263	0.267	0.250	3757.14	3814.29	3571.43	3714.29	3.71	0.10	3.71 ± 0.10	122.05	0.68									
	20 : 1	0	100	0.727	0.723	0.730	103857.14	103285.71	104285.71	103809.52	103.81	0.41	103.81 ± 0.41	0.00	0.00									
		1	100	0.345	0.323	0.303	49285.71	46142.86	43285.71	46238.10	46.24	2.45	46.24 ± 2.45	57.57	0.32									
		2	50	0.309	0.370	0.279	22071.43	26428.57	19928.57	22809.52	22.81	2.70	22.81 ± 2.70	81.00	0.45	43.57	0.17	43.57 ± 0.17	0.25	1.08	0.47	0.00	0.47 ± 0.00	0.45
		3	10	0.437	0.474	0.460	6242.86	6771.43	6571.43	6528.57	6.53	0.22	6.53 ± 0.22	97.28	0.54									
		4	10	0.454	0.469	0.425	6485.71	6700.00	6071.43	6419.05	6.42	0.26	6.42 ± 0.26	97.39	0.54									
	30 : 1	0	100	0.653	0.689	0.675	93285.71	98428.57	96428.57	96047.62	96.05	2.12	96.05 ± 0.12	0.00	0.00									
		1	100	0.481	0.377	0.401	68714.29	53857.14	57285.71	59952.38	59.95	6.35	59.95 ± 6.35	36.10	0.20									
		2	50	0.260	0.261	0.273	18571.43	18642.86	19500.00	18904.76	18.90	0.42	18.90 ± 0.42	77.14	0.43	48.00	1.06	48.00 ± 1.06	0.28	1.00	0.56	0.01	0.56 ± 0.01	0.50
		3	10	0.232	0.271	0.253	3314.29	3871.43	3614.29	3600.00	3.60	0.23	3.60 ± 0.23	92.45	0.51									
		4	10	0.421	0.403	0.43	6014.29	5757.14	6142.86	5971.43	5.97	0.16	5.97 ± 0.16	90.08	0.50									
	40 : 1	0	100	0.713	0.721	0.727	101857.14	103000.00	103857.14	102904.76	102.90	0.82	102.90 ± 0.82	0.00	0.00									
		1	100	0.443	0.497	0.460	63285.71	71000.00	65714.29	66666.67	66.67	3.22	66.67 ± 3.22	36.24	0.20									
		2	50	0.266	0.271	0.27	19000.00	19357.14	19285.71	19214.29	19.21	0.15	19.21 ± 0.15	83.69	0.46	45.23	0.36	45.23 ± 0.36	0.26	1.07	0.49	0.00	0.49 ± 0.00	0.47
		1	10	0.402	0.433	0.408	5742.86	6185.71	5828.57	5919.05	5.92	0.19	5.92 ± 0.19	96.99	0.54									
		2	10	0.454	0.507	0.45	6485.71	7242.86	6428.57	6719.05	6.72	0.37	6.72 ± 0.37	96.19	0.53									
	50 : 1	0	100	0.643	0.673	0.690	91857.14	96142.86	98571.43	95523.81	95.52	2.78	95.52 ± 2.78	0.00	0.00									
		1	100	0.392	0.440	0.426	56000.00	62857.14	60857.14	59904.76	59.90	2.88	59.90 ± 2.88	35.62	0.20									
		2	50	0.203	0.238	0.22	14500.00	17000.00	15714.29	15738.10	15.74	1.02	15.74 ± 1.02	79.79	0.44	37.24	1.08	37.24 ± 1.08	0.22	0.61	0.71	0.02	0.71 ± 0.02	0.39
		3	10	0.207	0.222	0.210	2957.14	3171.43	3000.00	3042.86	3.04	0.09	3.04 ± 0.09	92.48	0.51									
		4	10	0.318	0.352	0.338	4542.86	5028.57	4828.57	4800.00	4.80	0.20	4.80 ± 0.20	55.10	0.31									
	100 : 1	0	100	0.587	0.578	0.594	83857.14	82571.43	84857.14	83761.90	83.76	0.94	83.76 ± 0.94	0.00	0.00									
		1	100	0.424	0.485	0.444	60571.43	69285.71	63428.57	64428.57	64.43	3.63	64.43 ± 3.63	19.33	0.11									
		2	20	0.535	0.533	0.565	15285.71	15228.57	16142.86	15552.38	15.55	0.42	15.55 ± 0.42	68.21	0.38	138.18	1.54	138.18 ± 1.54	0.80	0.85	1.88	0.02	1.88 ± 0.02	1.44
		3	10	0.574	0.573	0.569	8200.00	8185.71	8128.57	8171.43	8.17	0.03	8.17 ± 0.03	75.59	0.42									
		4	10	0.518	0.473	0.477	7400.00	6757.14	6814.29	6990.48	6.99	0.29	6.99 ± 0.29	76.77	0.43									

ตารางที่ ค7 แสดงปริมาณกลูโคสที่เหลือ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงไอโซเลต AG2 และ NEW1 ในอาหาร basic medium และ calcium malate production ที่มีชนิดของแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน ตามลำดับ

ไอโซเลต	condition	เวลา (วัน)	การเจือจาง	ค่าดูดกลืนแสง			กลูโคสที่เหลืออยู่							กลูโคสที่ถูกใช้		แคลเซียมมาเลตที่ผลิตได้			แคลเซียมมาเลตตาม		ผลได้			อัตราการผลิต
				1	2	3	1	2	3	โครกรัมต่อมิลลิลิตร	กรัมต่อลิตร	SD	RS ± RD	กรัมต่อลิตร	โมล	กรัมต่อลิตร	SD	MA ± SD	โมล	โมล	โมลต่อโมล	SD	Y ± SD	กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง
AG 2	กลูโคส	0	100	0.729	0.720	0.726	104142.86	102857.14	103714.29	103571.43	103.57	0.53	103.57 ± 0.53	0.00	0.00	48.21	0.25	48.21 ± 0.25	0.28	1.07	0.52	0.00	0.52 ± 0.00	0.40
		5	20	0.237	0.241	0.239	6771.43	6885.71	6828.57	6828.57	6.83	0.05	6.83 ± 0.05	96.74	0.54									
	ไซโลส	0	100	0.711	0.702	0.709	101571.43	100285.71	101285.71	101047.62	101.05	0.55	101.05 ± 0.55	0.00	0.00	8.40	0.05	8.40 ± 0.05	0.05	0.90	0.11	0.00	0.11 ± 0.00	0.07
		5	50	0.471	0.464	0.469	33642.86	33142.86	33500.00	33428.57	33.43	0.21	33.43 ± 0.21	67.62	0.45									
	กากน้ำตาลไม่ปรับสภาพ	0	6000	0.348	0.322	0.341	224516.13	207741.94	220000.00	217419.35	217.42	7.09	217.42 ± 7.09	0.00	0.00	54.69	1.78	54.69 ± 1.78	0.32	1.16	0.55	0.02	0.55 ± 0.02	0.46
		5	3000	0.332	0.381	0.339	107096.77	122903.23	109354.84	113118.28	113.12	6.98	113.12 ± 6.98	104.30	0.58									
	กากน้ำตาลปรับสภาพ	0	6000	0.330	0.327	0.275	212903.23	210967.74	177419.35	200430.11	200.43	16.29	200.43 ± 16.29	0.00	0.00	78.08	6.35	78.08 ± 6.35	0.45	1.14	0.80	0.06	0.80 ± 0.06	0.65
		5	3000	0.301	0.309	0.302	97096.77	99677.42	97419.35	98064.52	98.06	1.15	98.06 ± 1.15	102.37	0.57									
	ซูโครส	0	1000	0.830	0.839	0.885	89247.31	90215.05	95161.29	91541.22	91.54	2.59	91.54 ± 2.59	0.00	0.00	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		5	500	0.850	0.880	0.851	45698.92	47311.83	45752.69	46254.48	46.25	0.75	46.25 ± 0.75	45.29	0.13									
	กลีเซอรอล	0	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		5	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA									
NEW	กลูโคส	0	100	0.798	0.780	0.784	114000.00	111428.57	112000.00	112476.19	112.48	1.10	112.48 ± 1.10	0.00	0.00	42.05	0.41	42.05 ± 0.41	0.24	1.19	0.41	0.00	0.41 ± 0.00	0.35
		5	10	0.388	0.400	0.394	5542.86	5714.29	5628.57	5628.57	5.63	0.07	5.63 ± 0.07	106.85	0.59									
	ไซโลส	0	100	0.754	0.742	0.748	107714.29	106000.00	106857.14	106857.14	106.86	0.70	106.86 ± 0..70	0.00	0.00	41.11	0.27	41.11 ± 0.27	0.24	1.35	0.35	0.00	0.35 ± 0.00	0.34
		5	10	0.398	0.402	0.409	5685.71	5742.86	5842.86	5757.14	5.76	0.06	5.76 ± 0.06	101.10	0.67									
	กากน้ำตาลไม่ปรับสภาพ	0	6000	0.388	0.381	0.374	250322.58	245806.45	241290.32	245806.45	245.81	3.69	245.81 ± 3.69	0.00	0.00	47.56	0.71	47.56 ± 0.71	0.28	1.20	0.46	0.01	0.46 ± 0.01	0.40
		5	3000	0.422	0.431	0.429	136129.03	139032.26	138387.10	137849.46	137.85	1.24	137.85 ± 1.24	107.96	0.60									
	กากน้ำตาลปรับสภาพ	0	6000	0.291	0.281	0.278	187741.94	181290.32	179354.84	182795.70	182.80	3.59	182.80 ± 3.59	0.00	0.00	74.83	1.47	74.83 ± 1.47	0.43	0.94	0.92	0.02	0.92 ± 0.02	0.62
		5	3000	0.301	0.309	0.302	97096.77	99677.42	97419.35	98064.52	98.06	1.15	98.06 ± 1.15	84.73	0.47									
	ซูโครส	0	1000	0.892	0.889	0.895	95913.98	95591.40	96236.56	95913.98	95.91	0.26	95.91 ± 0.26	0.00	0.00	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		5	500	0.839	0.841	0.838	45107.53	45215.05	45053.76	45125.45	45.13	0.07	45.13 ± 0.07	50.79	0.15									
	กลีเซอรอล	0	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		5	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA									

ภาคผนวก ง

การคำนวณที่เกี่ยวข้อง

การคำนวณหาปริมาณแคลเซียมมาเลตจากการไทรเทรต (FAO, 2006)

1 มิลลิลิตร (0.05 โมลาร์) EDTA	=	8.67 มิลลิกรัม แคลเซียมมาเลต

การคำนวณหาปริมาณแคลเซียมมาเลตทั้งหมด (กรัม)

$$\frac{\text{(น้ำหนักตะกอนทั้งหมด)} \times \text{(ปริมาณEDTA ที่ใช้)} \times (0.008607)}{\text{(น้ำหนักตะกอนที่ใช้ไทเทรต)}} \text{ กรัม}$$

การคำนวณหาโมลกลูโคสที่ถูกใช้ (โมล) (Mickelson, 1972)

$$\frac{\text{ปริมาณกลูโคสที่ถูกใช้ (กรัมต่อลิตร)}}{\text{(มวลโมเลกุลกลูโคสเท่ากับ 180)}} \text{ โมล}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การคำนวณหาปริมาณแคลเซียมมาเลตที่ผลิตได้ (โมล)

$$\frac{\text{แคลเซียมมาเลตที่ผลิตได้ (กรัมต่อลิตร)}}{\text{(มวลโมเลกุลแคลเซียมมาเลตเท่ากับ 172.14)}} \text{ โมล}$$

การคำนวณหาปริมาณแคลเซียมมาเลตที่ผลิตได้ตามทฤษฎี (โมล) (Ochsenreither, 2014)

จากทฤษฎี 1 โมลกลูโคส = 2 โมลกรดมาลิค

จึงสามารถหาโมลกรดมาลิคที่ผลิตได้จากการเทียบบัญญัติไทรยางค์

$$\text{กรดมาลิคที่ผลิตได้ตามทฤษฎี} = \frac{\text{โมลกลูโคสที่ถูกใช้ x 2 โมลกรดมาลิค}}{\text{1 โมลกลูโคส}}$$

การคำนวณผลได้ (โมลต่อโมล) (Mickelson, 1972)

$$\frac{\text{โมลแคลเซียมมาเลตที่ผลิตได้}}{\text{โมลกลูโคสที่ถูกใช้}}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สูตรการคำนวณอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน (Keeney และ Bremner, 1966)

มวลอะตอม

C = 12	H = 1	O = 16
N = 14	S = 32	

การคำนวณหาร้อยละคาร์บอนในกลูโคส

มวลโมเลกุล $C_6H_{12}O_6$ = $(12 \times 6) + (1 \times 12) + (16 \times 6)$

= 182 กรัมต่อโมล

มีคาร์บอน C_6 = (12×6)

= 72 กรัมต่อโมล

แทนค่าในสูตร

$$= \frac{(\text{มวลโมเลกุลคาร์บอน}) \times (100)}{(\text{มวลโมเลกุลกลูโคส})}$$

$$= \frac{(72) \times (100)}{(182)}$$

ร้อยละคาร์บอน = 39.56 ปัดเป็นค่าประมาณเท่ากับ 40

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การคำนวณหาร้อยละไนโตรเจนในแอมโมเนียมซัลเฟต

มวลโมเลกุล $(NH_4)_2SO_4$ = $(14 \times 2) + (1 \times 8) + (32) + (16 \times 4)$

= 132 กรัมต่อโมล

มีคาร์บอน C_6 = (14×2)

= 28 กรัมต่อโมล

แทนค่าในสูตร

$$= \frac{(\text{มวลโมเลกุลไนโตรเจน}) \times (100)}{(\text{มวลโมเลกุลแอมโมเนียมซัลเฟต})}$$

$$= \frac{28 \times 100}{132}$$

ร้อยละไนโตรเจน = 21.21 ปัดเป็นค่าประมาณเท่ากับ 20

การคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ไนโตรเจนใน Corn steep liquor

ร้อยละไนโตรเจน = 30 (Ligget และ Koffler, 1948)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตัวอย่างการคำนวณอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C:N ratio)

ตัวอย่างการคำนวณอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน ในอาหาร basic medium

กำหนดให้

แหล่งคาร์บอน คือ กลูโคส 100 กรัมต่อลิตร (มีคาร์บอนร้อยละ 40)

แหล่งไนโตรเจน คือ แอมโมเนียมซัลเฟต 2 กรัมต่อลิตร (มีไนโตรเจนร้อยละ 20)

แทนค่าในสูตร

$$= \frac{\text{ปริมาณกลูโคส} \times \text{ร้อยละคาร์บอนในกลูโคส}}{\text{ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต} \times \text{ร้อยละไนโตรเจนในแอมโมเนียมซัลเฟต}}$$

$$= \frac{(100 \times 40)}{(2 \times 20)}$$

$$= 100:1$$

ดังนั้น อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 100 : 1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตัวอย่างการคำนวณอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C:N ratio)

ตัวอย่างการคำนวณอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน ในอาหาร calcium malate production

กำหนดให้

แหล่งคาร์บอน คือ กลูโคส 100 กรัมต่อลิตร
(มีคาร์บอนร้อยละ 40)

แหล่งไนโตรเจน คือ corn steep liquor 0.5 ร้อยละโดยปริมาตร
(มีไนโตรเจนร้อยละ 20)

$$\text{แทนค่าในสูตร} = \frac{\text{ปริมาณกลูโคส} \times \text{ร้อยละคาร์บอนในกลูโคส}}{\text{ปริมาณ corn steep liquor} \times \text{ร้อยละไนโตรเจนใน corn steep liquor}}$$

$$= \frac{(100 \times 40)}{(5 \times 30)}$$

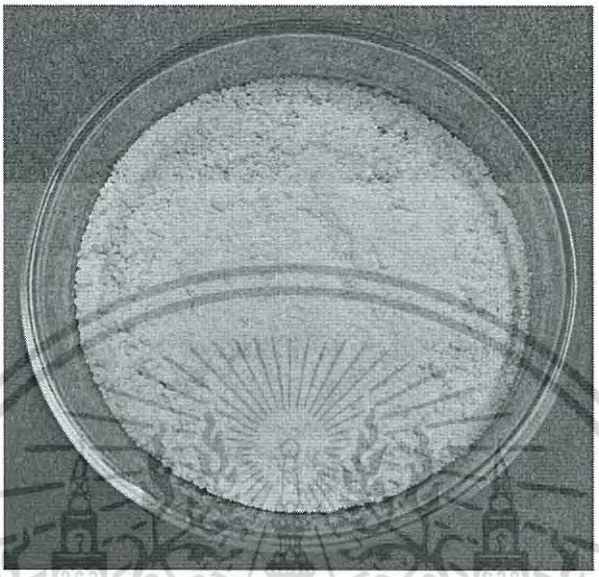
= 26.67 : 1 ปัดเป็นค่าประมาณเท่ากับ 30 : 1

ดังนั้น อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 30 : 1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก จ

รูปตัวอย่างตะกอนแคลเซียมมาเลต



(A)

(B)

รูปที่ จ1 รูปแสดงลักษณะตะกอนแคลเซียมมาเลตที่ได้จากการเพาะเลี้ยงไอโซเลต AG2 (A) และ NEW1 (B) ในอาหาร basic medium และ calcium malate production ตามลำดับ โดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้