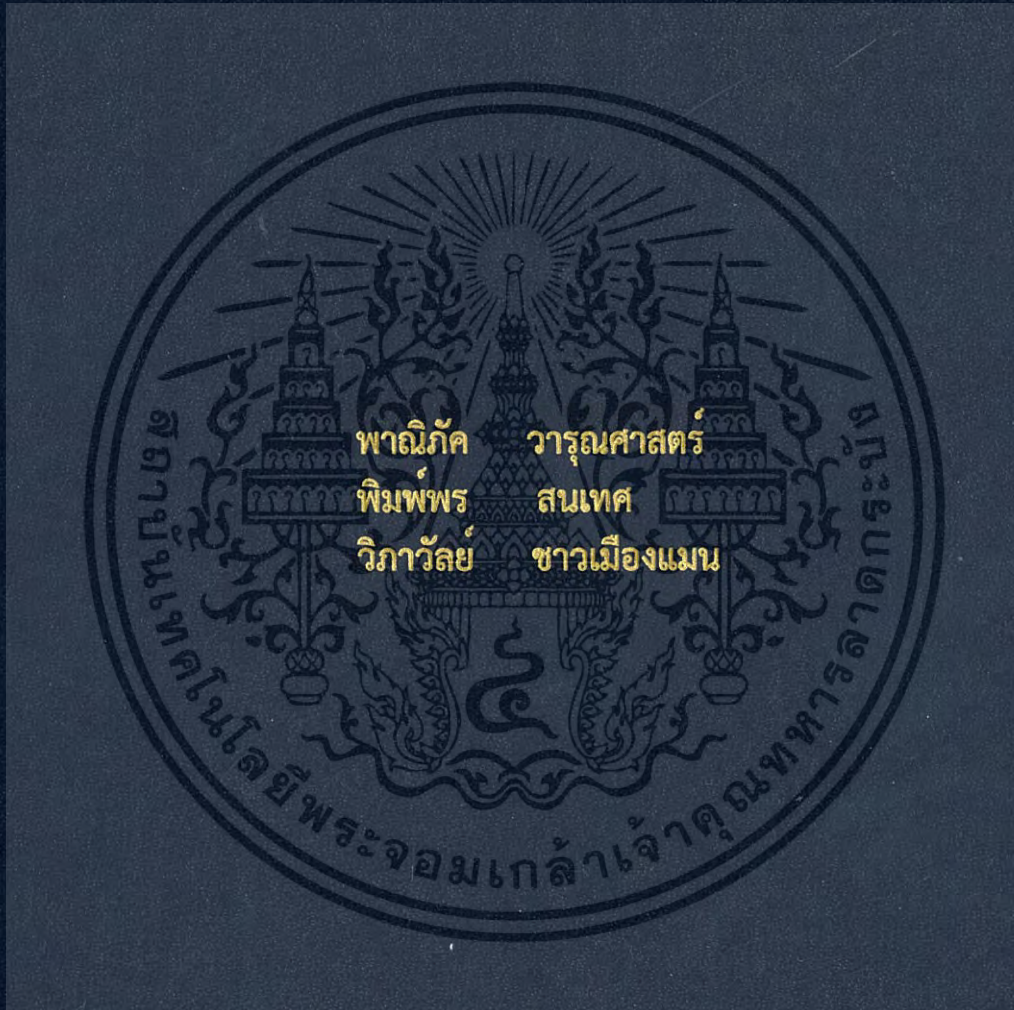


การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดมาลิกโดยแบคทีเรีย
ที่คัดแยกได้

OPTIMIZATION ON MALIC ACID PRODUCTION BY
ISOLATED BACTERIA



โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2558

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดมาลิกโดยแบคทีเรีย
ที่คัดแยกได้

OPTIMIZATION ON MALIC ACID PRODUCTION BY
ISOLATED BACTERIA



โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2558

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

OPTIMIZATION ON MALIC ACID PRODUCTION
BY ISOLATED BACTERIA



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 2015

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดมาลิกโดยแบคทีเรีย
ที่คัดแยกได้
Optimization on Malic Acid Production by Isolated Bacteria

ชื่อนักศึกษา นางสาวพานิภัค วารุณศาสตร์ รหัสนักศึกษา 55051349
นางสาวพิมพ์พร สนเทศ รหัสนักศึกษา 55051353
นางสาววิภาวัลย์ ชาวเมืองแมน รหัสนักศึกษา 55051393

ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชา ชีววิทยา
ปีการศึกษา 2558
อาจารย์ที่ปรึกษา ดร.สมพิศ สอนโยธา

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้
โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยา
อุตสาหกรรม) ประจำปีการศึกษา 2558

| คณะกรรมการสอบ | ลายมือชื่อ |
|--|--|
| ผศ.ดร.ดวงกมล เรือนงาม ประธานกรรมการ |  |
| อ.สิริกร ก่ออานันต์ กรรมการ | |
| ดร.สมพิศ สอนโยธา กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา |  |

ลิขสิทธิของคณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

| | | | |
|--------------------|---|-------------|-----------------------|
| หัวข้อโครงการพิเศษ | การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดมาลิกโดยแบคทีเรียที่คัดแยกได้ | | |
| ชื่อนักศึกษา | นางสาวพานิภัค | วารุณศาสตร์ | รหัสนักศึกษา 55051349 |
| | นางสาวพิมพ์พร | สนเทศ | รหัสนักศึกษา 55051353 |
| | นางสาววิภาวัลย์ | ชาวเมืองแมน | รหัสนักศึกษา 55051393 |
| ปริญญา | วิทยาศาสตร์บัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม) | | |
| ภาควิชา | ชีววิทยา | | |
| คณะ | วิทยาศาสตร์ | | |
| มหาวิทยาลัย | สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) | | |
| ปีการศึกษา | 2558 | | |
| อาจารย์ที่ปรึกษา | ดร.สมพิศ สอนโยธา | | |

บทคัดย่อ

โครงการพิเศษนี้ได้ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริเวณ 16S rRNA ของไอโซเลต AG2 และ DG2 ซึ่งถูกคัดแยกได้ก่อนหน้านี้ พบว่าไอโซเลต DG2 เป็นแกรมลบ รูปร่างเป็นท่อนสั้น และมีความคล้ายคลึงกับ *Acetobacter quananensis* ร้อยละ 98 แต่ไอโซเลต AG2 ยังไม่สามารถระบุชนิดของแบคทีเรียได้ เนื่องจากผลของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริเวณ 16s rRNA และลักษณะทางสัณฐานวิทยาไม่สอดคล้องกัน นอกจากนี้ยังได้ทำการศึกษาผลของชนิดของอาหาร ความเข้มข้นของกลูโคสและความเข้มข้นของแคลเซียมคาร์บอเนตต่อการผลิตกรดมาลิก ผลการทดลองพบว่าไอโซเลต AG2 สามารถผลิตกรดมาลิกได้สูงสุดเท่ากับ 25.00 ± 6.10 กรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร shaker culture medium ที่มีกลูโคสความเข้มข้นเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร และมีแคลเซียมคาร์บอเนต 10 กรัมต่อลิตร ในขณะที่ไอโซเลต DG2 สามารถผลิตกรดมาลิกได้สูงสุดเท่ากับ 4.02 ± 0.03 กรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร shaker culture medium ที่มีกลูโคสความเข้มข้นเริ่มต้น 150 กรัมต่อลิตร และมีแคลเซียมคาร์บอเนต 50 กรัมต่อลิตร

คำสำคัญ : กรดมาลิก กลูโคส แคลเซียมคาร์บอเนต Shaker culture medium

| | | | |
|---------------|--|--------------|---------------------|
| Title | Optimization on Malic acid Production by Isolated Bacteria | | |
| Students | Miss Paniphak | Warunsarth | Student ID 55051349 |
| | Miss Pimporn | Sontes | Student ID 55051353 |
| | Miss Vipawan | Chawmuangman | Student ID 55051393 |
| Degree | Bachelor of Science (Industrial Microbiology) | | |
| Department | Biology | | |
| Faculty | Science | | |
| University | King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL) | | |
| Academic Year | 2015 | | |
| Advisor | Dr. Somphit | Sornyotha | |

Abstract

In this special project, the malic acid producing bacteria, the isolates AG2 and DG2 which screening from previous study were identified. Base on 16S rRNA gene analysis and morphological properties, the isolate DG2 was Gram-negative, short rod-shaped bacterium and closely related to *Acetobacter quananensis* with 98% sequence similarity. However, 16S rRNA gene analysis and morphological properties of the isolate AG2 were quite different. Then, the AG2 could not be able to classify. In addition, the effects of different parameters such as culture mediums, concentration of glucose, and concentration of calcium carbonate on malic acid production were studied. The result showed that the isolate AG2 was produced the highest concentration of malic acid at 25.00 ± 6.10 g/L, when grown in shaker culture medium containing an initial glucose concentration of 100 g/L as the carbon source in the presence of 10 g/L of calcium carbonate. While the isolate DG2 was produced the highest concentration of malic acid at 4.02 ± 0.03 g/L, when grown in shaker culture medium containing an initial glucose concentration of 150 g/L as the carbon source in the presence of 50 g/L of calcium carbonate.

Keywords : Malic acid, Glucose, Calcium carbonate, Shaker culture medium.

กิตติกรรมประกาศ

โครงการพิเศษเล่มนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี เนื่องจากผู้จัดทำได้รับความกรุณาและความช่วยเหลือจากบุคคลผู้มีพระคุณหลายท่าน ดังนี้

ขอขอบพระคุณ ดร.สมพิศ สอนโยธา อาจารย์ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาโครงการพิเศษ ที่ได้ให้ความกรุณาในการเสนอแนะแนวทางแก้ไขปัญหา ให้คำปรึกษาและคำแนะนำอย่างใกล้ชิด ตลอดจนตรวจแก้โครงการพิเศษเล่มนี้ให้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.ดวงกมล เรืองงามและอาจารย์สิริกร ก่ออนันต์ อาจารย์ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ได้ให้ความกรุณาให้คำปรึกษา ตลอดจนชี้แนะแนวทางการแก้ไขปัญหา ทำให้โครงการพิเศษเล่มนี้ให้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการวิทยาศาสตร์ เจ้าหน้าที่ห้องธุรการ เจ้าหน้าที่ฝ่ายอาคารสถานที่ คณะวิทยาศาสตร์ ตลอดจนแม่บ้านประจำตึกทุกๆท่านที่ให้ความร่วมมือ อำนวยความสะดวกและให้คำปรึกษาในการทำโครงการพิเศษนี้ให้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

ขอขอบพระคุณ บิดา มารดา และญาติพี่น้องทุกท่านที่ได้ให้ความช่วยเหลือและคอยให้กำลังใจตลอดระยะเวลาของการทำโครงการพิเศษนี้

ขอขอบคุณ เพื่อนๆ พี่ๆ และน้องๆ ทุกคน ที่ให้การช่วยเหลือ ให้คำปรึกษาแนะนำในเรื่องต่างๆ และคอยเป็นกำลังใจให้ตลอดระยะเวลาของการทำโครงการพิเศษนี้

คณะผู้จัดทำหวังเป็นอย่างยิ่งว่าโครงการพิเศษเล่มนี้จะเป็นประโยชน์สำหรับผู้ที่มีความสนใจในงานที่เกี่ยวข้องทางด้านนี้ สุดท้ายนี้หากโครงการพิเศษเล่มนี้มีข้อผิดพลาดประการใด ทางคณะผู้จัดทำขออภัยมา ณ โอกาสนี้ด้วย

พณิชภัค วารุณศาสตร์

พิมพ์พร สนเทศ

วิภาวัลย์ ชาวเมืองแมน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

| | หน้า |
|---|----------|
| บทคัดย่อภาษาไทย..... | ก |
| บทคัดย่อภาษาอังกฤษ | ข |
| กิตติกรรมประกาศ..... | ค |
| สารบัญ | ง |
| สารบัญตาราง | ช |
| สารบัญรูปภาพ..... | ฉ |
| บทที่ 1 บทนำ..... | 1 |
| 1.1 ที่มาและความสำคัญของโครงการพิเศษ..... | 1 |
| 1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการพิเศษ..... | 2 |
| 1.3 ขอบเขตของโครงการพิเศษ..... | 2 |
| 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ..... | 2 |
| บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... | 3 |
| 2.1 กรดมาลิก..... | 3 |
| 2.2 สังเคราะห์กรดมาลิกโดยกระบวนการทางชีวภาพ (biosynthesis of malic acid)..... | 4 |
| 2.2.1 การสังเคราะห์กรดมาลิกโดยการตรึงเอนไซม์ฟูมาเรส..... | 4 |
| 2.2.2 การสังเคราะห์กรดมาลิกผ่านเอนไซม์โดยการตรึงเซลล์..... | 5 |
| 2.2.3 การผลิตกรดมาลิกจากกลูโคส..... | 6 |
| 2.2.3.1 วิธีกรดซิตริก (Citric acid cycle)..... | 6 |
| 2.2.3.2 ปฏิกิริยาแอนาเพอโรติก (Anaplerotic Reaction)..... | 7 |
| 2.2.4 การผลิตกรดมาลิกจากกรดไขมัน..... | 8 |
| 2.3 จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตกรดมาลิก..... | 11 |
| 2.4 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดมาลิก..... | 12 |
| 2.5 การประยุกต์ใช้กรดมาลิก..... | 19 |
| 2.5.1 การสังเคราะห์พอลิเมอร์..... | 19 |
| 2.5.2 อุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม..... | 19 |
| 2.5.3 คุณสมบัติการเป็นสารคีเลต..... | 19 |
| 2.5.4 อุตสาหกรรมการแพทย์..... | 20 |
| 2.5.5 อุตสาหกรรมการผลิตเครื่องสำอาง..... | 20 |
| 2.6 การจำแนกชนิดของแบคทีเรีย..... | 21 |
| 2.6.1 ลักษณะทางด้านสัณฐานวิทยา (Morphological characteristics)..... | 21 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

| | หน้า |
|---|-----------|
| 2.6.2 องค์ประกอบทางเคมีของเซลล์ (Chemical composition)..... | 21 |
| 2.6.3 ลักษณะของการเลี้ยงแบคทีเรีย (Bacteria Cultural characteristics)..... | 21 |
| 2.6.4 ลักษณะทางเมแทบอลิซึม (Metabolic characteristics)..... | 21 |
| 2.6.5 ลักษณะทางด้านพันธุกรรม (Genetic characteristics)..... | 21 |
| 2.7 High performance liquid chromatography (HPLC)..... | 22 |
| 2.7.1 เฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) และตัวทำละลาย..... | 23 |
| 2.7.2 เครื่องสูบ (Pump)..... | 23 |
| 2.7.3 ระบบการฉีดตัวอย่าง..... | 24 |
| 2.7.4 คอลัมน์..... | 25 |
| 2.7.5 ชนิดของคอลัมน์ (Types of column packings)..... | 25 |
| 2.7.6 ตัวตรวจจับ (Detectors)..... | 25 |
| บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย..... | 26 |
| 3.1 เครื่องและอุปกรณ์..... | 26 |
| 3.2 สารเคมี..... | 27 |
| 3.3 ขั้นตอนการดำเนินการ..... | 28 |
| 3.3.1 แบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษา..... | 28 |
| 3.3.2 การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของแบคทีเรีย..... | 28 |
| 3.3.2.1 การย้อมแกรม..... | 28 |
| 3.3.2.2 การย้อมสปอร์..... | 29 |
| 3.3.3 การสกัด genomic DNA จากแบคทีเรีย..... | 29 |
| 3.3.4 การเพิ่มปริมาณ 16s DNA โดยใช้เทคนิค PCR..... | 30 |
| 3.3.5 การทำ 16s DNA ให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุด QIAquick® PCR Purification Kit..... | 32 |
| 3.3.6 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดมาลิก..... | 32 |
| 3.3.6.1 การเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้น..... | 32 |
| 3.3.6.2 การศึกษาผลของชนิดของอาหารต่อการผลิตกรดมาลิก..... | 33 |
| 3.3.6.3 การศึกษาผลของกลูโคสเริ่มต้นต่อการผลิตกรดมาลิก..... | 33 |
| 3.3.6.4 การศึกษาผลของปริมาณแคลเซียมคาร์เนตต่อการผลิตกรดมาลิก..... | 33 |
| 3.3.6.5 การวิเคราะห์ปริมาณกรดมาลิกและสารเมตาบอไลต์ต่างๆ..... | 34 |
| บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล..... | 35 |
| 4.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาทั่วไปของจุลินทรีย์..... | 35 |
| 4.2 การศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของจุลินทรีย์โดยการตรวจสอบยีน 16s rRNA..... | 39 |
| 4.3 ผลของชนิดของอาหารต่อการผลิตกรดมาลิก..... | 42 |
| 4.4 ผลของปริมาณกลูโคสเริ่มต้นต่อการผลิตกรดมาลิก..... | 44 |
| 4.5 ผลของปริมาณแคลเซียมคาร์เนตเริ่มต้นต่อการผลิตกรดมาลิก..... | 53 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นอญูาตเ็นหาไปไซ่ประเยชนดานการค้

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

| | หน้า |
|---|------|
| บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ..... | 63 |
| 5.1 สรุปผลการวิจัย..... | 63 |
| 5.2 ข้อเสนอแนะ..... | 63 |
| เอกสารอ้างอิง..... | 65 |
| ภาคผนวก..... | 69 |
| ภาคผนวก ก สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ..... | 70 |
| ภาคผนวก ข วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลเมื่อใช้ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 100 150 200 และ 250 กรัมต่อลิตร..... | 71 |
| ภาคผนวก ค วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลเมื่อใช้ความเข้มข้นแคลเซียมคาร์บอเนต 10 30 และ 50 กรัมต่อลิตร..... | 76 |



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

| ตารางที่ | หน้า |
|---|------|
| 2.1 จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตกรดมาลิกได้..... | 12 |
| 2.2 แสดงความเร็วรอบต่างๆ อัตราการใช้กลูโคส และร้อยละผลได้ของ <i>A. flavus</i> ที่เวลา 160 ชั่วโมง..... | 13 |
| 2.3 แสดงปริมาณ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ที่ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณมวลเซลล์ อัตราการใช้กลูโคส และร้อยละผลได้ของ <i>A. flavus</i> เมื่อครบ 160 ชั่วโมง..... | 14 |
| 2.4 แสดงความเข้มข้นของโลหะไอออน Fe^{2+} Mg^{2+} และ Mn^{2+} อัตราการใช้กลูโคส และร้อยละผลได้ของ <i>A. flavus</i> เมื่อครบ 160 ชั่วโมง..... | 14 |
| 2.5 ผลของความเข้มข้นของน้ำตาลจากซังข้าวโพดที่ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกต่อการผลิตกรดมาลิกในพลาสติก..... | 16 |
| 2.6 แสดงปริมาณกรดมาลิกที่ <i>A. pullulan</i> CCTCCM 2012223 ผลิตได้ เมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนต่างๆ..... | 17 |
| 2.7 ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตกรดมาลิกของ <i>A. oryzae</i> NRRL 3488 เมื่อใช้กลูโคสเริ่มต้น 50 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน..... | 18 |
| 3.1 แสดงส่วนประกอบปริมาตรที่ใช้ในปฏิกิริยา 50 ไมโครลิตร ในการทำ Master mix..... | 31 |
| 3.2 แสดงสถานะขั้นตอนต่างๆ ในการใช้ตัวอย่างเข้าเครื่อง DNA thermal cycle..... | 31 |
| 4.1 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาทั่วไปของไอโซเลต AG2 DG1 และ DG2..... | 36 |
| 4.2 ชนิดของจุลินทรีย์และชนิดของแหล่งคาร์บอนที่สามารถผลิตกรดมาลิกได้..... | 41 |
| 4.3 ปริมาณกรดมาลิกที่จุลินทรีย์ผลิตได้เมื่อใช้สูตรอาหาร selective medium และ shaker culture medium..... | 42 |
| 4.4 ผลของกลูโคสเริ่มต้นที่ความเข้มข้น 100 150 200 และ 250 กรัมต่อลิตรต่อปริมาณกรดมาลิก ร้อยละผลได้ และอัตราการผลิตของไอโซเลต AG2 และ DG2..... | 44 |
| 4.5 ผลของปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตเริ่มต้นที่ความเข้มข้น 10 30 และ 50 กรัมต่อลิตรต่อปริมาณกรดมาลิก ร้อยละผลได้ และอัตราการผลิตของไอโซเลต AG2 และ DG2..... | 53 |
| ข1 การเจือจางสารละลายกลูโคสมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ..... | 71 |
| ข2 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลืออยู่ของไอโซเลต AG2 เมื่อใช้กลูโคสเริ่มต้น 100 150 200 และ 250 กรัมต่อลิตร และแคลเซียมคาร์บอเนต 30 กรัม..... | 72 |
| ข3 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลืออยู่ของไอโซเลต DG2 เมื่อใช้กลูโคสเริ่มต้น 100 และ 150 กรัมต่อลิตร และแคลเซียมคาร์บอเนต 30 กรัม..... | 74 |
| ค1 การเจือจางสารละลายกลูโคสมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ..... | 76 |
| ค2 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลืออยู่ของไอโซเลต AG2 เมื่อใช้แคลเซียมคาร์บอเนต 10 30 และ 50 กรัมต่อลิตร..... | 77 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง(ต่อ)

ตารางที่

หน้า

ค3 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลืออยู่ของไอโซเลต DG2 เมื่อใช้แคลเซียมคาร์บอเนต 10 กรัมต่อลิตร

.....78



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูปภาพ

| รูปที่ | หน้า |
|---|------|
| 2.1 แสดงโครงสร้างทั่วไปของกรดมาลิก..... | 4 |
| 2.2 แสดงโครงสร้าง D(+) และ L(-) form ของกรดมาลิก..... | 4 |
| 2.3 วิถีกรดซิตริก (Citric acid cycle)..... | 7 |
| 2.4 ปฏิกริยาแอนาเพอโรติก (Anaplerotic Reaction)..... | 8 |
| 2.5 วิถีกรดซิตริก (Citric acid cycle) ของเชื้อ <i>M. tuberculosis</i> | 9 |
| 2.6 วิถีไกลออกซิเลต (Glyoxylate cycle) ของเชื้อ <i>M. tuberculosis</i> | 10 |
| 2.7 วิถีเมทิลซิเตรต (Methyl citrate cycle) ของเชื้อ <i>M. tuberculosis</i> | 11 |
| 2.8 ระบบการทำงานของเครื่อง High performance liquid chromatography..... | 23 |
| 2.9 ระบบการฉีดตัวอย่างแบบ “Sampling loop”..... | 24 |
| 4.1 แสดงปริมาณมวลเซลล์ แห่่งไนโตรเจน (แอมโมเนีย) กลูโคสที่ลดลงและมาเลตที่เพิ่มขึ้นที่ระยะเวลาต่างๆ..... | 43 |
| 4.2 กราฟแสดงปริมาณกลูโคสที่เหลือ กรดมาลิก และพีเอชที่ระยะเวลาต่างๆเมื่อเพาะเลี้ยงไอโซเลต AG2 ในอาหารที่มีกลูโคสความเข้มข้น 100 (A) 150 (B) 200 (C) และ 250 (D) กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนเริ่มต้น โดย ◆ คือปริมาณกลูโคสที่เหลือ (กรัมต่อลิตร) ■ คือปริมาณกรดมาลิก (กรัมต่อลิตร) และ ▲ คือค่าพีเอช..... | 47 |
| 4.3 กราฟแสดงปริมาณกรดมาลิกและร้อยละผลได้ของไอโซเลต AG2 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีกลูโคสความเข้มข้นเริ่มต้น 100 150 200 และ 250 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน โดย ■ คือกรดมาลิก (กรัมต่อลิตร) และ ■ คือร้อยละผลได้..... | 48 |
| 4.4 กราฟแสดงปริมาณกลูโคสที่เหลือ กรดมาลิก และพีเอชที่ระยะเวลาต่างๆเมื่อเพาะเลี้ยงไอโซเลต DG2 ในอาหารที่มีกลูโคสความเข้มข้น 100 (A) 150 (B) 200 (C) และ 250 (D) กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนเริ่มต้น โดย ◆ คือปริมาณกลูโคสที่เหลือ (กรัมต่อลิตร) ■ คือปริมาณกรดมาลิก (กรัมต่อลิตร) และ ▲ คือค่าพีเอช..... | 50 |
| 4.5 กราฟแสดงปริมาณกรดมาลิกและร้อยละผลได้ของไอโซเลต DG2 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีกลูโคสความเข้มข้นเริ่มต้น 100 150 200 และ 250 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน โดย ■ คือกรดมาลิก (กรัมต่อลิตร) และ ■ คือร้อยละผลได้..... | 51 |
| 4.6 กราฟแสดงปริมาณกลูโคสที่เหลือ กรดมาลิก และพีเอชที่ระยะเวลาต่างๆเมื่อเพาะเลี้ยงไอโซเลต AG2 ในอาหารที่มีแคลเซียมคาร์บอเนตความเข้มข้นเริ่มต้น 10 (A) 30 (B) และ 50 (C) กรัมต่อลิตร และใช้กลูโคสเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน โดย ◆ คือปริมาณกลูโคสที่เหลือ (กรัมต่อลิตร) ■ คือปริมาณกรดมาลิก (กรัมต่อลิตร) และ ▲ คือค่าพีเอช..... | 56 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูปภาพ(ต่อ)

| รูปที่ | หน้า |
|---|------|
| 4.7 กราฟแสดงปริมาณกรดมาลิกและร้อยละผลได้ของไอโซเลต AG2 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีกลูโคสความเข้มข้นเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และใช้ปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนต 10 30 และ 50 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดย ■ คือกรดมาลิก (กรัมต่อลิตร) และ ■ คือร้อยละผลได้..... | 57 |
| 4.8 กราฟแสดงปริมาณกลูโคสที่เหลือ กรดมาลิก และพีเอชที่ระยะเวลาต่างๆเมื่อเพาะเลี้ยงไอโซเลต DG2 ในอาหารที่มีแคลเซียมคาร์บอเนตความเข้มข้นเริ่มต้น 10 (A) 30 (B) และ 50 (C) กรัมต่อลิตร และใช้กลูโคสเริ่มต้น 150 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน โดย ◆ คือปริมาณกลูโคสที่เหลือ (กรัมต่อลิตร) ■ คือปริมาณกรดมาลิก (กรัมต่อลิตร) และ ▲ คือค่าพีเอช..... | 59 |
| 4.9 กราฟแสดงปริมาณกรดมาลิกและร้อยละผลได้ของไอโซเลต DG2 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีกลูโคสความเข้มข้นเริ่มต้น 150 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และใช้ปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนต 10 30 และ 50 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อ ■ คือกรดมาลิก (กรัมต่อลิตร) และ ■ คือร้อยละผลได้..... | 60 |
| 4.10 การเจริญของ <i>Escherichia coli</i> ในอาหารที่ถูกจำกัดแมนนิทอล (สารอินทรีย์) โดยกำหนดให้ 1 ยูนิทเท่ากับ 0.8 ไมโครกรัมน้ำหนักแห้งต่อมิลลิลิตร..... | 61 |

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย

กรดมาลิก (Malic acid) เป็นสารตัวกลางที่จำเป็นสำหรับเมตาบอลิซึมของเซลล์ และสามารถนำมาใช้เป็นวัตถุเจือปนในอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม โดยใช้คุณสมบัติการเป็นสารคีเลตซึ่งจะทำปฏิกิริยากับโลหะและไอออนของโลหะอัลคาไลน์เอิร์ท (alkaline earth metals) ในอาหาร ใช้ในการรักษาตับที่ทำงานผิดปกติและภาวะมีแอมโมเนียในกระแสเลือดสูง ใช้เป็นส่วนประกอบของกรดอะมิโน และใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางเป็นส่วนประกอบของครีมต้านริ้วรอย นอกจากนี้ยังใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับผลิตพอลิเมอร์ที่สามารถย่อยสลายได้ตามธรรมชาติอีกด้วย (Hronska และคณะ, 2014)

กรดมาลิกมีกระบวนการสังเคราะห์ได้ 2 แบบหลักๆ คือ การสังเคราะห์ทางเคมีและการสังเคราะห์ทางชีวภาพ เช่น กระบวนการหมักโดยใช้จุลินทรีย์ การสังเคราะห์กรดมาลิกด้วยกระบวนการทางเคมีทำได้โดยปฏิกิริยาไฮดราซันคือการเติมน้ำให้กรดฟูมาริก (Fumaric acid) หรือกรดมาลิก (Maleic acid) ภายใต้ความดันและอุณหภูมิสูง ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีโครงสร้างแบบผสม คือมีทั้งโครงสร้างแบบดี (D-form) และแบบแอล (L-form) ซึ่งละลายน้ำได้น้อยกว่าโครงสร้างแบบดี หรือแบบแอลเพียงอย่างเดียว (Hronska และคณะ, 2014) แต่โครงสร้างแบบดีนั้นสิ่งมีชีวิตไม่สามารถนำไปใช้ได้ ส่วนการสังเคราะห์กรดมาลิกผ่านกระบวนการหมักโดยจุลินทรีย์นั้นพบว่า ปริมาณกรดมาลิกที่ผลิตได้มีความเข้มข้นต่ำกว่าการสังเคราะห์ทางเคมีร่วมกับชีวภาพ แต่กรดมาลิกที่ได้เป็นโครงสร้างแบบแอล ซึ่งสิ่งมีชีวิตสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้เลย อีกทั้งกระบวนการผลิตไม่ส่งผลเสียต่อสิ่งแวดล้อม ทั้งนี้ในปัจจุบันมีความต้องการใช้กรดมาลิกในอุตสาหกรรมจำนวนมาก โดยนำกรดมาลิกมาใช้เป็นกรดทางเลือกแทนกรดซิตริก (Sauer และคณะ, 2008) อีกทั้งกรดมาลิกยังเป็นสารตั้งต้นในการผลิตสารเคมีที่มีมูลค่าสูง โดยใช้ของเหลือทางการเกษตรเป็นแหล่งพลังงาน จึงต้องการการผลิตที่มากขึ้นโดยคาดว่าในอนาคตจะมีความต้องการใช้กรดมาลิกมากกว่า 200,000 ตันต่อปี (Zou และคณะ, 2015)

จากการศึกษาของประภัสสร เทพกัณฑ์และสุพรรณนิภา ยอดสง่า (2557) ได้ทำการคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดมาลิกจากแหล่งธรรมชาติ โดยพบแบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดมาลิกได้สูง ได้แก่ ไอโซเลท DG2 AG2 และ DG1 ผลิตกรดมาลิกได้ 68.964 68.660 และ 49.241 กรัมต่อลิตรตามลำดับ ดังนั้นโรงงานพิเศษนี้จึงสนใจที่จะศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มการผลิตกรดมาลิกจากแบคทีเรียที่คัดแยกได้เหล่านี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการพิเศษ

1. เพื่อระบุชนิดของแบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษา
2. เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดมาลิกของแบคทีเรียที่ถูกคัดเลือก โดยศึกษาชนิดของสูตรอาหาร ความเข้มข้นเริ่มต้นของกลูโคสและความเข้มข้นเริ่มต้นของแคลเซียมคาร์บอเนต

1.3 ขอบเขตของโครงการพิเศษ

1. จำแนกชนิดของแบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดมาลิกได้สูงโดยการตรวจสอบลักษณะทางพันธุกรรม โดยการเปรียบเทียบลำดับเบสที่ตำแหน่งยีน 16s rRNA
2. ศึกษาผลของชนิดของสูตรอาหารระหว่างสูตร selective medium และ shaker culture medium ต่อการผลิตกรดมาลิก
3. ศึกษาผลของความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นที่ 100 150 200 และ 250 กรัมต่อลิตร ต่อการผลิตกรดมาลิก
4. ศึกษาผลของความเข้มข้นแคลเซียมคาร์บอเนตเริ่มต้นที่ 10 30 และ 50 กรัมต่อลิตร ต่อการผลิตกรดมาลิก
5. วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลที่เหลืออยู่ด้วยวิธีการ Dinitrosalicylic colorimetric (DNS)
6. ตรวจสอบปริมาณกรดมาลิกที่ผลิตได้ด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบชนิดของแบคทีเรียที่มีความสามารถผลิตกรดมาลิกได้สูง
2. ใช้เป็นแนวทางในการผลิตกรดมาลิกในอนาคตต่อไป
3. ลดการใช้สารเคมีที่ก่อให้เกิดการปนเปื้อนและเป็นมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม
4. ลดปริมาณการนำเข้ากรดมาลิกจากต่างประเทศ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

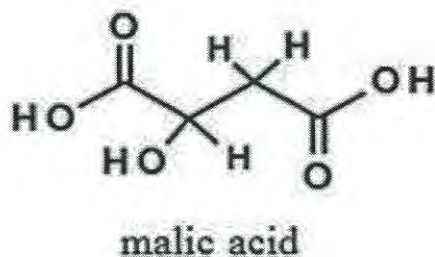
บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 กรดมาลิก

กรดมาลิก (Malic acid) คือกรดอินทรีย์ชนิดหนึ่ง ที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น อุตสาหกรรมการผลิตอาหาร ลูกกวาด เครื่องดื่ม และการผลิตยารักษาโรค ซึ่งผลิตภัณฑ์เหล่านี้ในวันนี้ จะมีความต้องการมากขึ้นเนื่องจากการเพิ่มขึ้นของจำนวนประชากร แต่ปริมาณของกรดอินทรีย์ที่ผลิตได้ในประเทศไทยมีปริมาณต่ำ จึงจำเป็นต้องมีการนำเข้าจากต่างประเทศซึ่งมีมูลค่าปีละหลาย ล้านบาท และมีแนวโน้มจะเพิ่มสูงขึ้นเรื่อยๆ กรดอินทรีย์ที่มีการนำเข้าเป็นจำนวนมากได้แก่ กรด แลคติก กรดมาลิก กรดกลูตามิก และกรดทาร์ทาริก (ปิยะนุช เนียมทรัพย์, 2540)

กรดมาลิกสามารถผลิตได้จากการสังเคราะห์ทางเคมี และการสังเคราะห์ทางชีวภาพ เช่น กระบวนการหมักโดยใช้จุลินทรีย์ (Peleg และคณะ, 1988) ซึ่งในกระบวนการหมักของจุลินทรีย์ กรดมาลิกที่เกิดขึ้นนั้นเกิดจากหลายกระบวนการทั้ง Glycolysis pathway, TCA cycle เป็นต้น กรดมาลิกมีรูปร่างเป็นผลึกขนาดเล็กสีขาวจัดอยู่ในกลุ่มสาร C4 Dicarboxylic acid มีสูตรทางเคมี คือ $C_4H_6O_5$ (รูปที่ 2.1) มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 134.09 กรัมต่อโมล จุดหลอมเหลวเท่ากับ 101 ถึง 103 องศาเซลเซียส และมีค่าความหนาแน่นเท่ากับ 1.595 กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร (ปิยะนุช เนียมทรัพย์, 2540) เป็นกรดที่ถูกใช้เป็นสารตัวหลักในอุตสาหกรรมเคมีและอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม (Abe และคณะ, 1962) สามารถพบได้ในผลไม้ชนิดต่างๆหลายชนิด โดยผลไม้ที่พบกรดมาลิกมากที่สุดคือแอปเปิ้ลจึงถูกเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า กรดแอปเปิ้ล กรดมาลิกมีโครงสร้าง 2 แบบ คือ แบบดีและแบบแอล (รูปที่ 2.2) แต่กรดมาลิกที่พบในธรรมชาติจะพบอยู่ในรูปของโครงสร้างแบบ แอล ซึ่งเป็นกรดอินทรีย์ที่มีความสำคัญในวัฏจักรเครบส์ (ปิยะนุช เนียมทรัพย์, 2540)



รูปที่ 2.1 แสดงโครงสร้างทั่วไปของกรดมาลิก
ที่มา : Krull และคณะ (1991)



2.2 การสังเคราะห์กรดมาลิกโดยกระบวนการทางชีวภาพ (biosynthesis of malic acid)

2.2.1 การสังเคราะห์กรดมาลิกโดยการตรึงเอนไซม์ฟูมาเรส

การสังเคราะห์กรดมาลิกโดยการตรึงเอนไซม์ฟูมาเรส โดยใช้กรดฟูมาริกเป็นสารตั้งต้น กระบวนการนี้เรียกอีกชื่อหนึ่งว่า Transcrystallization (Rose และคณะ, 1978)

ปัจจุบันในอุตสาหกรรมการผลิตพลาสติกนั้นจะมีผลิตภัณฑ์ที่เป็นผลพลอยได้คือกรดฟูมาริก มีการนำเอากรดฟูมาริกมาประยุกต์ใช้ แต่มีข้อจำกัดที่คือกรดฟูมาริกมีอัตราการละลายที่ต่ำ จึงได้มีการปรับเปลี่ยนกรดฟูมาริกด้วยเอนไซม์ฟูมาเรสไปเป็นกรดมาลิกโครงสร้างแบบแอลนั้น ที่มีความสามารถในการละลายที่สูงกว่า และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆได้อย่างหลากหลายเช่น อุตสาหกรรมอาหาร โดยการเปลี่ยนกรดฟูมาริกไปเป็นกรดมาลิกโครงสร้างแบบแอล เอกสาร (Curcio และคณะ, 2002) เกิดจากการตรึงเอนไซม์ฟูมาเรสในถังปฏิกรณ์หมักเบียร์ โดยเอนไซม์จะ ค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เก็บกักที่บริเวณ asymmetric capillary membrane ที่ทำมาจากโพลีซัลโฟน (polysulfone) มีชั้นรูพรุน (spongy layer) และชั้นบาง (thin layer) อยู่ภายใน โดยเอนไซม์ฟูมาเรสจะสามารถผ่านชั้นรูพรุนได้ แต่ไม่สามารถผ่านชั้นบางเนื่องจากขนาดนั้นไม่สัมพันธ์กัน (Giorno และคณะ, 2000)

Giorno และคณะ (2000) ทำการทดลองในสภาวะที่เอนไซม์ถูกตรึง การตรึงเอนไซม์ฟูมาเรสเริ่มจากการเตรียมเอนไซม์ฟูมาเรสปริมาตร 5 มิลลิลิตรรวมกับน้ำบริสุทธิ์ 195 มิลลิลิตร และใช้เมมเบรนมีพื้นที่ผิวหน้า 25 ตารางเซนติเมตร โดยใช้เอนไซม์ฟูมาเรส 80 มิลลิโมล ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส พีเอช 7 อัตราการไหล 140 มิลลิลิตรต่ออนาที และความดันแตกต่างผ่านเมมเบรน (TMP) ที่ 0.2 บาร์ พบว่าเมื่อเอนไซม์ผ่านเมมเบรนสารตั้งต้นมีการทำปฏิกิริยาสูงถึงร้อยละ 80 มีอัตราการเกิดปฏิกิริยา 2 มิลลิโมลต่อตารางเซนติเมตรต่อชั่วโมง และมีกิจกรรมของเอนไซม์ฟูมาเรส 1.42 มิลลิกรัมต่อชั่วโมงต่อกรัม (Giorno และคณะ, 2000)

2.2.2 การสังเคราะห์กรดมาลิกโดยการตรึงเซลล์

การสังเคราะห์กรดมาลิกโดยการตรึงเซลล์ ปัจจุบันได้มีการพยายามใช้กระบวนการเปลี่ยนกรดกรดฟูมาริกไปเป็นกรดมาลิกโครงสร้างแบบแอล โดยการตรึงเซลล์จุลินทรีย์ ดังเช่น

การศึกษาของ Yamamoto และคณะ (1976) ได้ทำการตรึงเซลล์แบบ polyacrylamide gel lattice โดยใช้ *Brevibacterium ammoniagenes* สายพันธุ์ IAM1675 ซึ่งมีกิจกรรมของเอนไซม์ฟูมาเรสสูง แต่มีข้อเสียคือสามารถผลิตกรดซัคซินิกเป็นผลพลอยได้สูง จึงมีการทดลองเติมสารลดแรงตึงผิวต่างๆเพื่อปรับสภาพและเปรียบเทียบปริมาณของกรดมาลิกและกรดซัคซินิก เช่น เซทิลไพริดีเนียมคลอไรด์ (CPC) โซเดียมลอริลซัลเฟต (SLS) ไทรตันเอ็กซ์ 100 (Triton X-100) และสารสกัดน้ำดี เป็นต้น พบว่าถ้าตรึงเซลล์โดยไม่ผ่านการปรับสภาพ ปริมาณกรดมาลิกที่ผลิตได้คือ 990 ไมโครโมลต่อชั่วโมงต่อกรัมเซลล์และมีปริมาณกรดซัคซินิก ประมาณร้อยละ 2.5-5 โมลของกรดมาลิก แต่เมื่อปรับสภาพด้วยสารลดแรงตึงผิวแล้ว พบว่ามีปริมาณของกรดมาลิกที่สูงขึ้นและกรดซัคซินิกที่ต่ำลง โดยการปรับสภาพด้วยสารสกัดน้ำดีให้ผลที่ดีที่สุด คือ มีปริมาณกรดมาลิกที่ผลิตได้คือ 7480 ไมโครโมลต่อชั่วโมงต่อกรัมเซลล์ และกรดซัคซินิกน้อยกว่าร้อยละ 0.2 โมลของกรดมาลิก แสดงให้เห็นว่าสารสกัดน้ำดีช่วยเพิ่มปริมาณของกรดมาลิก เนื่องจากสารลดแรงตึงผิวมีผลต่อการแลกเปลี่ยนสารเข้าและออกเซลล์ สภาวะในการเพาะเลี้ยงที่ใช้คือ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พีเอช 7.5 และใช้ปริมาณสารสกัดน้ำดีร้อยละ 0.2 (ปริมาตรต่อปริมาตร)

การศึกษาของ Takata และคณะ (1980) กล่าวว่าได้มีการพัฒนาประสิทธิภาพการผลิตกรดมาลิกจากกรดฟูมาริก โดยการใช้คาร์บอนไดร็อกไซด์ *Brevibacterium flavum* ทดลองทำการหมักแบบต่อเนื่องโดยใช้เซลล์ตรึง *B. flavum* 100 มิลลิลิตร ในเจลาคาร์บอนที่มีความเข้มข้นร้อยละ 3.4 ได้กรดมาลิก 16 กรัม และมีการเกิดกรดซัคซินิกขึ้นด้วย ซึ่งเป็นเรื่องยากที่จะแยกกรดซัคซินิกออกจากกรดมาลิก เพื่อการใช้ประโยชน์ในทางอุตสาหกรรมที่ต้องการกรดมาลิกที่บริสุทธิ์และลดปริมาณของกรดซัคซินิก ดังนั้นในการทดลองตรึงเซลล์นี้จึงมีการปรับสภาพด้วยการเติมสารต่างๆได้แก่ สารสกัดน้ำดี เมทานอล หรือบิวทานอล พบว่าการปรับสภาพด้วยแอลกอฮอล์มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ฟูมาเรสขณะที่การปรับสภาพด้วยสารสกัดน้ำดีมีปริมาณกรดมาลิกเพิ่มขึ้นและกรดซัคซินิกลด

เอกสารนี้เพิ่มผลผลิตสารที่สังเคราะห์ด้วยเซลล์ตรึงซึ่งมีผลผลิตน้ำดีที่มีปริมาณสูงในแง่ประโยชน์และการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดลง จึงทำการทดลองปรับสภาพด้วยการใช้สารสกัดน้ำดีที่ความเข้มข้นต่างๆ ตั้งแต่ร้อยละ 0.2 (ปริมาตรต่อ ปริมาตร) ขึ้นไป พบว่าสารสกัดน้ำดีที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.6 (ปริมาตรต่อปริมาตร) นั้นมีกิจกรรมของเอนไซม์ฟูมาเรสสูงสุด โดยสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเซลล์นี้คือสารสกัดน้ำดีความเข้มข้น ร้อยละ 0.6 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ที่พีเอช 7.0 และเมื่อเปรียบเทียบกับการตรึงเซลล์ *B. ammoniagenes* แบบ polyacrylamide gel lattice แล้วพบว่าการตรึงเซลล์ *B. flavum* โดยใช้คาราจีแนนนั้นให้ผลผลิตที่สูงกว่าถึง 5.2 เท่า

Neufeld และคณะ (1991) รายงานว่า ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์ที่สามารถเปลี่ยนกรดกรดฟูมาริกไปเป็นกรดมาลิกด้วยอัตราสูงสุดที่ 65 มิลลิโมลต่อกรัมต่อชั่วโมง และประมาณร้อยละ 87 ของกรดฟูมาริกจะเปลี่ยนเป็นกรดมาลิกภายใน 45 นาที จึงได้ทำการทดลองโดยตรึงเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae* ใน agarose bead ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 2.4 มิลลิเมตร ที่บรรจุภายใน agarose microsphere ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 193 และ 871 ไมโครเมตร พบว่าเอนไซม์จะทำงานได้สูงขึ้นเมื่อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ agarose bead ลดลง

2.2.3 การผลิตกรดมาลิกจากกลูโคส

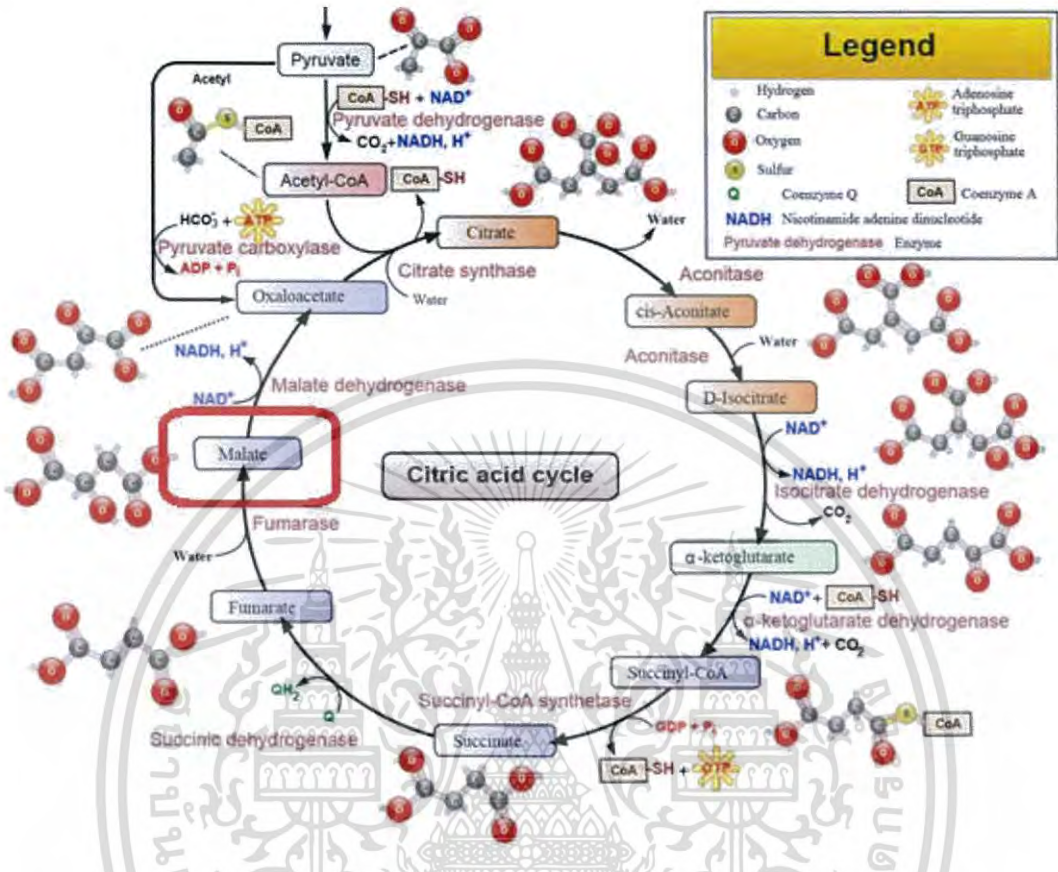
การสังเคราะห์กรดมาลิกด้วยกระบวนการทางชีวภาพ โดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ โดยจุลินทรีย์จะเปลี่ยนกลูโคสให้เป็นกรดไพรูเวทผ่านวิถีไกลโคไลซิสในไซโทซอล โดยกลูโคส 1 โมเลกุลจะสามารถสังเคราะห์กรดไพรูเวทได้ 2 โมเลกุล และได้ ATP 2 โมเลกุล (Kosugi และคณะ, 2013)

2.2.3.1 วิธีกรดซิตริก (Citric acid cycle)

กรดไพรูเวทที่ได้จากการเปลี่ยนกลูโคสผ่านวิถีไกลโคไลซิสจะถูกส่งผ่านเข้าไปในไมโทคอนเดรียและเปลี่ยนเป็นอะซิติล โคเอ (acetyl-CoA) เพื่อที่จะเข้าวิถีกรดซิตริก (Citric acid cycle) เมื่อเข้าวิถีกรดซิตริก อะซิติล โคเอ รวมตัวกับออกซาโลอะซิเตต (oxaloacetate) แล้วเปลี่ยนไปเป็นซิเตรต (citrate) โดยใช้เอนไซม์ ซิเตรตซินเทส (citrate synthase) ร่วมกับการเติมน้ำและนำโคเอ ออก ต่อมาเปลี่ยนซิเตรตไปเป็นไอโซซิเตรต (isocitrate) โดยใช้เอนไซม์อะโคนิเทส (aconitase) จากนั้นเปลี่ยนไอโซซิเตรตไปเป็นอัลฟาคีโตกลูตาเรต (α -ketoglutarate) โดยใช้เอนไซม์ไอโซซิเตรต ดีไฮโดรจีเนส (isocitrate dehydrogenase) ร่วมกับการเติม NAD^+ นำเอาคาร์บอนไดออกไซด์ $NADH$ และ H^+ ออก ต่อมาเปลี่ยนอัลฟาคีโตกลูตาเรตไปเป็นซักซินิล โคเอ (succinyl-CoA) โดยใช้เอนไซม์อัลฟาคีโตกลูตาเรต ดีไฮโดรจีเนส (α -ketoglutarate dehydrogenase) ร่วมกับการเติมโคเอและ NAD^+ นำเอาคาร์บอนไดออกไซด์ $NADH$ และ H^+ ออก ต่อมาเปลี่ยนซักซินิล โคเอ ไปเป็นซักซินเนต (succinate) โดยใช้เอนไซม์ซักซินิล โคเอซินเทส (succinyl-CoA synthase) ร่วมกับการเติม GDP และฟอสเฟต นำเอา GTP และโคเอออก ต่อมาเปลี่ยนซักซินเนตไปเป็นฟูมาเรตโดยใช้เอนไซม์ซักซินเนต ดีไฮโดรจีเนส (succinate dehydrogenase) ร่วมกับการเติม FAD และนำเอา $FADH_2$ ออก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ท้ายสุดเปลี่ยนฟูมาเรตไปเป็นมาเลตโดยใช้เอนไซม์ฟูมาเรสร่วมกับการเติมน้ำ (รูปที่ 2.5) (Kosugi และคณะ, 2013)



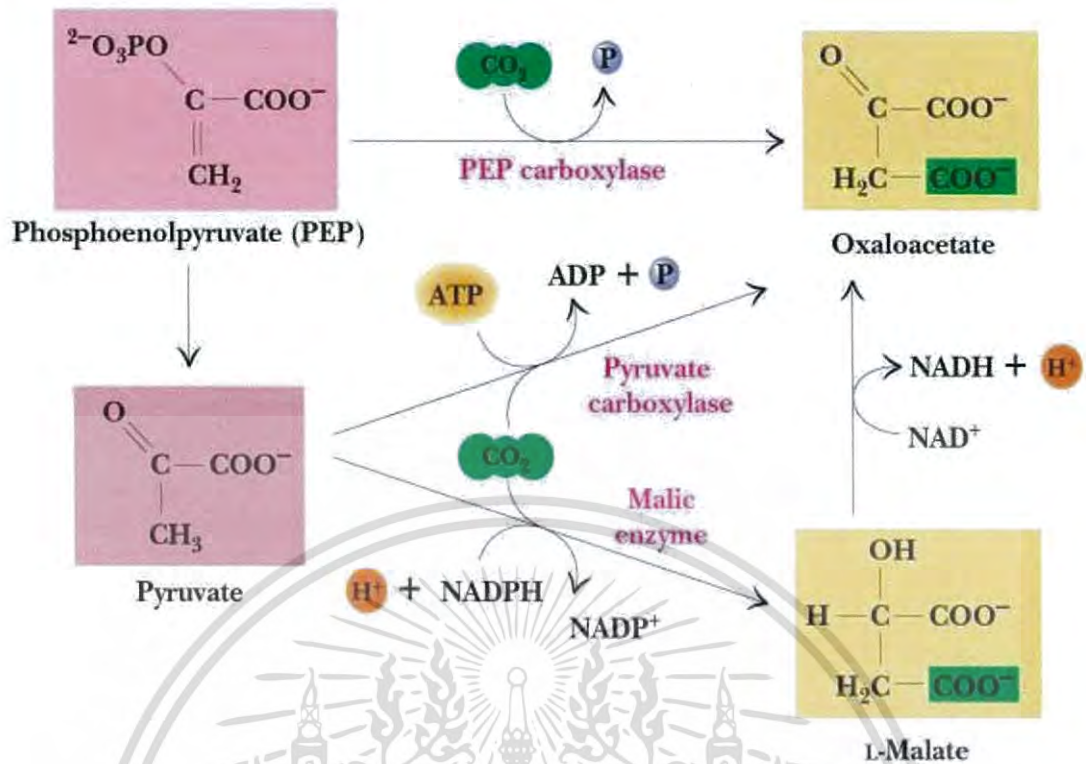
รูปที่ 2.3 วิธีการซิตริก (Citric acid cycle)

ที่มา : <http://strengthtrainingforyou.blogspot.com/2015/07/energy-systems-of-human.html>

2.2.3.2 ปฏิกิริยาแอนาเพอโรติก (Anaplerotic Reaction)

ถ้าออกซาโลอะซิเตตซึ่งเป็นสารตัวกลางในวิธีการซิตริกนั้นถูกใช้ในกระบวนการสังเคราะห์ กรดซิตริกจนกระทั่งเหลือออกซาโลอะซิเตตไม่เพียงพอสำหรับการทำปฏิกิริยากับอะซีติล โคเอ ปฏิกิริยาแอนาเพอโรติกจะได้รับการกระตุ้นให้เกิดขึ้นมา มีการสลายไพรูเวทให้เปลี่ยนเป็นพลังงาน ในขณะที่ไม่มีความจำเป็นต้องสลายฟอสโฟพีนอลไพรูเวทที่ให้พลังงานสูง โดยมีเอนไซม์ที่เกี่ยวกับการสังเคราะห์ออกซาโลอะซิเตตคือ ไพรูเวทคาร์บอกซิเลต (pyruvate carboxylase) ทำหน้าที่เปลี่ยนไพรูเวทโดยการเติม ATP ร่วมกับคาร์บอนไดออกไซด์ ได้ผลิตภัณฑ์เป็นออกซาโลอะซิเตต ADP และฟอสเฟต ส่วนเอนไซม์ที่เกี่ยวกับการสังเคราะห์มาเลตคือ เอนไซม์มาลิก (Malic enzyme) ทำหน้าที่เปลี่ยนไพรูเวทโดยการเติม NADPH H⁺ ร่วมกับคาร์บอนไดออกไซด์ ได้ผลิตภัณฑ์เป็นมาเลตและ NADP⁺ (รูปที่ 2.6) (Michal และ Schomburg, 2012)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



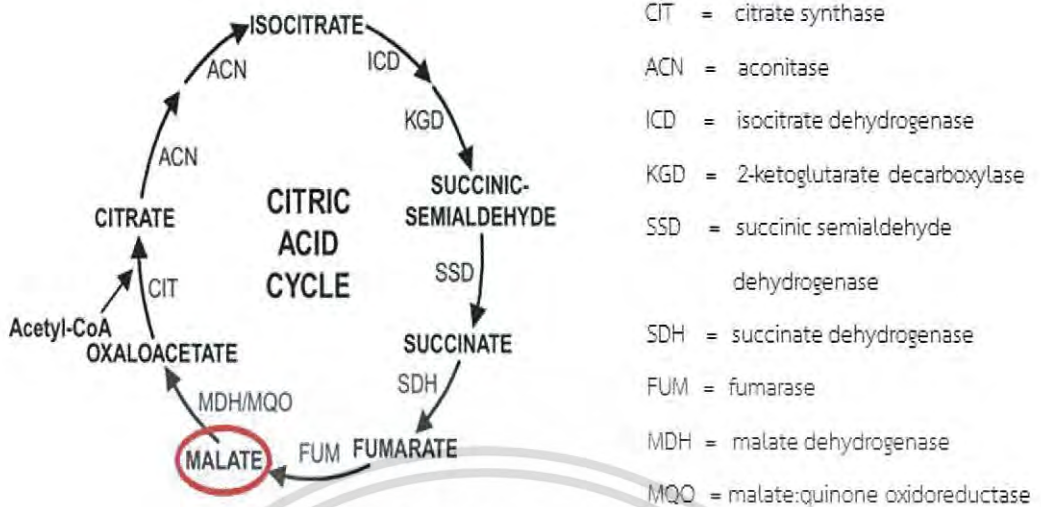
รูปที่ 2.4 ปฏิกิริยาแอนาเพลโรติก (Anaplerotic Reaction)

ที่มา : <http://www.chem.uwec.edu/Webpapers2000/Pages/Webpapers2000/burichsl/media/anaplerotic.jpg>

2.2.4 การผลิตกรดมาลิกจากกรดไขมัน

Muñoz-Elías และคณะ (2006) พบว่า *Mycobacterium tuberculosis* ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรควัณโรค มีความสามารถแบ่งตัวได้ทั้งภายในและภายนอกเซลล์เจ้า สามารถดำรงชีวิตโดยใช้กรดไขมันได้ดีกว่าน้ำตาล ซึ่งความสามารถในการใช้กรดไขมันเป็นแหล่งคาร์บอนนั้นมีความเกี่ยวข้องกับ 3 วิธี ได้แก่

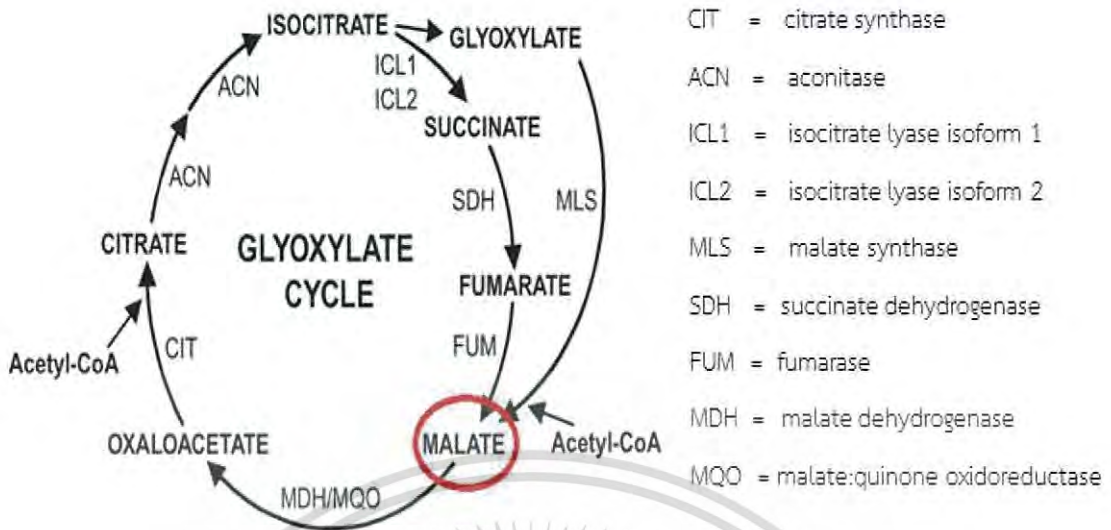
2.2.4.1 วิธีกรดซิตริก (Citric acid cycle) ซึ่งเป็นสารตัวกลางของวิถีไกลอกลิซิส มีการสลายสายโซ่ของกรดไขมันผ่านวิถี β -oxidation เป็นกรดไขมันสายสั้นๆ เพื่อสร้าง อะซิติล โคเอ เข้าวิถีกรดซิตริก (รูปที่ 2.7) ดังที่อธิบายไว้ตามหัวข้อ 2.3.3.1 (Muñoz-Elías และคณะ, 2006)



รูปที่ 2.5 วิถีกรดซิตริก (Citric acid cycle) ของเชื้อ *M. tuberculosis*

ที่มา : Muñoz-Elías และคณะ (2006)

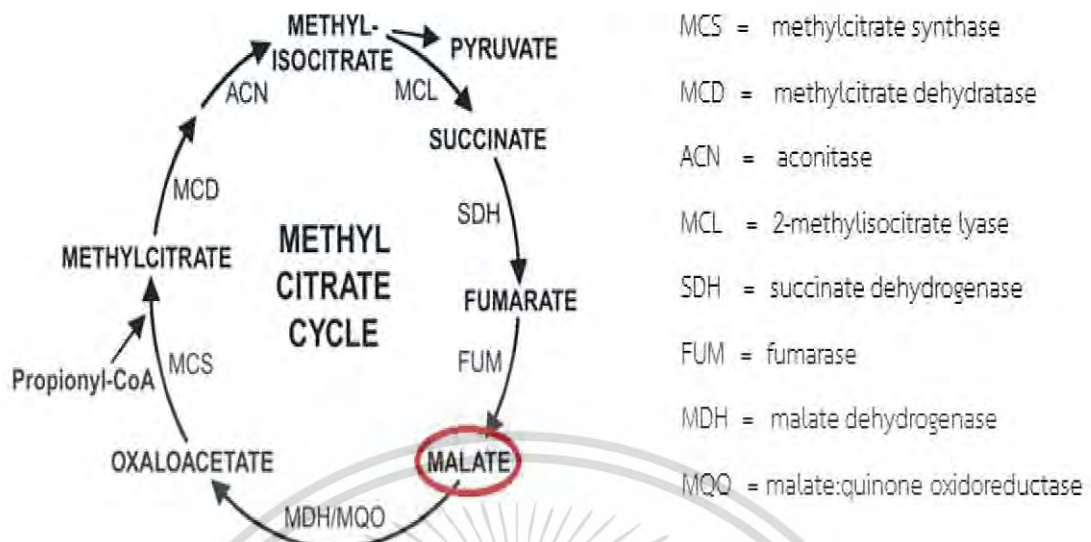
2.2.4.2 วิถีไกลออกซิเลต (Glyoxylate cycle) มีการสลายสายโซ่ของกรดไขมันผ่านวิถี β -oxidation เป็นกรดไขมันสายสั้นๆ เพื่อสร้าง อะซิติก โคเอ เช่นเดียวกับวิถีกรดซิตริก แต่เมื่อเข้าวิถีกรดซิตริกแล้ว สารตัวกลางไอโซซิเตรตนั้นจะสามารถเปลี่ยนไปเป็นซักซิเนตและไกลออกซิเลตผ่าน เอนไซม์ไอโซซิเตรต ไลเอส (isocitrate lyase) ซึ่งไกลออกซิเลตสามารถเปลี่ยนไปเป็นมาเลตผ่าน เอนไซม์มาเลตซินเทส (malate synthase) ส่วนซักซิเนตสามารถเปลี่ยนไปเป็นฟูมาเรตโดยใช้ เอนไซม์ซักซิเนตดีไฮโดรจีเนส และเปลี่ยนฟูมาเรตไปเป็นมาเลตโดยใช้เอนไซม์ฟูมาเรส (รูปที่ 2.8) (Muñoz-Elías และคณะ, 2006)



รูปที่ 2.6 วิถีไกลออกซิเลต (Glyoxylate cycle) ของเชื้อ *M. tuberculosis*

ที่มา : Muñoz-Elías และคณะ (2006)

2.2.4.3 วิถีเมทิลซิเตรต (Methyl citrate cycle) มีการสลายสายโซ่ของกรดไขมันผ่านวิถี β -oxidation เป็นกรดไขมันสายสั้นๆ เพื่อสร้างโพรพิโอนิล โคเอ (propionyl-CoA) เข้าวิถีเมทิลซิเตรต โดยร่วมกับออกซาลออะซิเตตเพื่อเปลี่ยนเป็นเมทิลซิเตรต (methylcitrate) โดยผ่านเอนไซม์เมทิลซิเตรต ซินเทเรต (methylcitrate synthase) ต่อมาเปลี่ยนเมทิลซิเตรตไปเป็นเมทิลไอโซซิเตรต (methylisocitrate) โดยผ่านเอนไซม์เมทิลซิเตรต ดีไฮโดรจีเนส (methylcitrate dehydratase) ร่วมกับอะโคนิเทส (aconitase) ต่อมาเปลี่ยนเมทิลไอโซซิเตรตไปเป็นฟูมาเรตและซัคซิเนตโดยผ่านเอนไซม์ 2-เมทิลไอโซซิเตรต ไลเกส (2-methylisocitrate lyase) ต่อมาซัคซิเนตเปลี่ยนไปเป็นฟูมาเรตโดยใช้เอนไซม์ซัคซิเนต ดีไฮโดรจีเนส และเปลี่ยนฟูมาเรตไปเป็นมาเลตโดยใช้เอนไซม์ฟูมาเรส (รูปที่ 2.9) (Muñoz-Elías และคณะ, 2006)



รูปที่ 2.7 วิถีเมทิลซิเตรต (Methyl citrate cycle) ของเชื้อ *M. tuberculosis*
ที่มา : Muñoz-Eliás และคณะ, 2006

2.3 จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตกรดมาลิก

จากรายงานเกี่ยวกับจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตกรดมาลิกได้นั้น พบว่ามีรายงานเกี่ยวกับทั้งจุลินทรีย์สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลายที่ผ่านการตัดต่อทางพันธุกรรมเพื่อการผลิตกรดมาลิก และจากรายงานพบว่าเชื้อรา *Aspergillus flavus* สามารถผลิตกรดมาลิกได้ปริมาณ 58.4 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร แต่ในการเจริญเติบโตของ *A. flavus* จะผลิตสารไมโครท็อกซินซึ่งเป็นสารพิษออกมาปะปนกับกรดมาลิกที่ผลิตได้ จึงเป็นข้อจำกัดของการนำ *A. flavus* ไปใช้ประโยชน์ (Peleg และคณะ, 1988 ; Zelle และคณะ, 2008 ; Zhang และคณะ, 2011)

Payne และคณะ (2006) ได้มีการศึกษาหาจุลินทรีย์ชนิดใหม่ที่สามารถผลิตกรดมาลิกได้ โดยได้ใช้ *Saccharomyces cerevisiae* และ *Escherichia coli* สายพันธุ์ดั้งเดิม พบว่าการผลิตกรดมาลิกในปริมาณที่น้อยมาก ดังนั้นจึงมีการนำเชื้อรา *Aspergillus oryzae* สายพันธุ์ NRRL3488 และ NRRL3485 มาผลิตกรดมาลิก โดยใช้กลูโคสเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร พบว่าสามารถผลิตกรดมาลิกได้ 38.86 และ 23.12 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยสายพันธุ์ NRRL3488 สามารถผลิตกรดมาลิกได้ในปริมาณที่สูงกว่าสายพันธุ์ NRRL3485

Zou และคณะ (2014) ได้นำยีสต์ดำ *Aureobasidium pullulans* มาผลิตกรดมาลิกพบว่าสามารถผลิตกรดมาลิกได้ในปริมาณที่ใกล้เคียงกับผลการทดลองการผลิตกรดมาลิกจากเชื้อรา *Aspergillus oryzae* สายพันธุ์ NRRL3488 โดยจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตกรดมาลิกได้แสดงไว้ในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตกรดมาลิกได้

| จุลินทรีย์ | สายพันธุ์ | แหล่งคาร์บอน | ความเข้มข้นเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร) | กรดมาลิก (กรัมต่อลิตร) | เอกสารอ้างอิง |
|---|-----------|--------------|--------------------------------------|---------------------------|-----------------------------|
| <i>Aspergillus flavus</i> | ดั้งเดิม | กลูโคส | 100.00 | 58.40 | Peleg และคณะ, 1988 |
| <i>Aspergillus flavus</i> | ดั้งเดิม | กลูโคส | 100.00 | 39.00 | Battat และคณะ, 1990 |
| <i>Aspergillus flavus</i> ATCC 13697 | ดั้งเดิม | กลูโคส | 120.00 | 113.00 | Battat และคณะ, 1990 |
| <i>Schizophyllum commune</i> | ดั้งเดิม | กลูโคส | 50.00 | 18.00 | Kawagoe และคณะ, 1997 |
| <i>Zygosaccharomyces rouxii</i> | ดั้งเดิม | กลูโคส | 300.00 | 75.00 | Taing O. และ Taing K., 2007 |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | ดั้งเดิม | กลูโคส | 100.00 | 0.19 | Zelle และคณะ, 2008 |
| <i>Escherichia coli</i> | ดั้งเดิม | กลูโคส | 100.00 | 0.47 | Zhang และคณะ, 2011 |
| <i>Aspergillus oryzae</i> NRRL 3488 | ดั้งเดิม | กลูโคส | 100.00 | 38.86 | Brown และคณะ, 2013 |
| <i>Aspergillus oryzae</i> NRRL 3488 | ดั้งเดิม | กลูโคส | 50.00 | 34.00 | Knuf และคณะ, 2013 |
| <i>Nocardia</i> sp. CCM 4837/A | ดั้งเดิม | กลูโคส | 120.00 | 62.90 | Hronska และคณะ, 2014 |
| <i>Aureobasidium pullulan</i> | ดั้งเดิม | ไซโลส | 90.00 | 38.60 | Zou และคณะ, 2014 |
| <i>Aureobasidium pullulan</i> CCTCCM 2012223 | ดั้งเดิม | กลูโคส | 110.00 | 15.27 | Zou และคณะ, 2015 |
| <i>Ustilago trichophora</i> TZ1 | ดั้งเดิม | กลีเซอรอล | 150.00 | 196.00 | Zambanini และคณะ, 2016 |
| <i>Monascus araneosus</i> | กลาย | กลูโคส | 100.00 | 28.00 | Lumyong และคณะ, 1993 |
| <i>Aspergillus oryzae</i> SaMF 2103a-68 Z (C4t318/MDH/PYC) | กลาย | กลูโคส | 100.00 | 59.10 | Brown และคณะ, 2013 |
| <i>Aspergillus oryzae</i> ShTh1040-22 (C4T318) | กลาย | กลูโคส | 100.00 | 45.20 | Brown และคณะ, 2013 |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> K901 DNPR 38 | กลาย | กลูโคส | 100.00 | 0.45 | Kosugi และคณะ, 2013 |

2.4 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดมาลิก

Battat และคณะ (1990) ได้ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดมาลิกโดยใช้ *Aspergillus flavus* ในถังหมักแบบปั่นกววน โดยศึกษาปัจจัยที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ ความเร็วในการปั่นกววน อัตราการให้อากาศ ความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้น ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน และชนิดของโออออนโลหะ

อาหารเหลวที่ใช้สำหรับการผลิตกรด ประกอบด้วย กลูโคส 100 กรัมต่อลิตร NH_4Cl 2.0 กรัมต่อลิตร KH_2PO_4 0.15 กรัมต่อลิตร K_2HPO_4 0.15 กรัมต่อลิตร $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 กรัมต่อลิตร $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.1 กรัมต่อลิตร $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.005 กรัมต่อลิตร NaCl 0.005 กรัมต่อลิตร และ CaCO_3 60 กรัมต่อลิตร (Battat และคณะ, 1990)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำหรับความเร็วในการปั่นกววน ทำการทดสอบที่ความเร็วรอบ 300 350 400 และ 450 รอบต่อนาที จากผลในตารางที่ 2.2 พบว่าเมื่อผ่านไป 160 ชั่วโมงที่ความเร็วรอบ 450 รอบต่อนาที มีผลได้สูงสุดที่ร้อยละ 71 และในขณะที่ความเร็วรอบเพิ่มขึ้นจึงทำให้ผลได้มากขึ้น ปริมาณกรดมาลิกสูงสุดที่ความเร็วรอบ 300 และ 450 รอบต่อนาที เท่ากับ 36.0 และ 39.0 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (Battat และคณะ, 1990)

ตารางที่ 2.2 แสดงความเร็วรอบต่างๆ อัตราการใช้กลูโคส และร้อยละผลได้ ของ *A. flavus* ที่เวลา 160 ชั่วโมง (Battat และคณะ, 1990)

| ความเร็วรอบ (รอบต่อนาที) | การใช้กลูโคส (โมล) | ร้อยละผลได้ ของกรดมาลิก |
|-----------------------------|-----------------------|----------------------------|
| 300 | 0.54 | 51.00 |
| 350 | 0.38 | 57.00 |
| 400 | 0.46 | 56.00 |
| 400 (1.0 vvm) | 0.40 | 58.00 |
| 450 | 0.41 | 71.00 |

สำหรับผลของอัตราการให้อากาศและความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้น ทำการทดลองโดยเพาะเลี้ยง *A. flavus* โดยให้อากาศที่อัตรา 0.5 และ 1.0 ลิตรอากาศต่อลิตรอาหารต่อนาที (ที่ความเร็วรอบ 400 รอบต่อนาที) เมื่อผ่านไป 160 ชั่วโมง พบว่าการผลิตกรดไม่ได้ต่างกันอย่งมีนัยสำคัญ และสังเกตปริมาณของออกซิเจนที่ละลายในน้ำ พบว่าเมื่อผ่านไป 20 ชั่วโมง ที่อัตราการให้อากาศ 0.05 ลิตรอากาศต่อลิตรอาหารต่อนาที เหลือออกซิเจนที่ละลายน้ำอยู่ร้อยละ 20 ส่วนที่ 1.0 ลิตรอากาศต่อลิตรอาหารต่อนาที เหลือออกซิเจนละลายน้ำอยู่ร้อยละ 22 เมื่อผ่านไป 20 ชั่วโมง สำหรับความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นที่ใช้ตั้งแต่ 100 120 และ 140 กรัมต่อลิตร พบว่าค่าผลได้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (Battat และคณะ, 1990)

ผลของความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตกรดมาลิก พบว่าเมื่อใช้ความเข้มข้น $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ เริ่มต้น 271 มิลลิกรัมต่อลิตร (เท่ากับ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.28 กรัมต่อลิตร) จะได้ปริมาณกรดมาลิก 41.0 กรัมต่อลิตรและผลได้สูงสุดร้อยละ 98 เมื่อใช้กลูโคส 0.31 โมล (Battat และคณะ, 1990) ผลการทดลองที่ได้แสดงดังตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 แสดงปริมาณ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ที่ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณมวลเซลล์ อัตราการใช้ กลูโคส และร้อยละผลได้ของ *A. flavus* เมื่อครบ 160 ชั่วโมง (Battat และคณะ, 1990)

| ปริมาณ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ เริ่มต้น (มิลลิกรัมต่อลิตร) | มวลเซลล์ (กรัมต่อลิตร) | การใช้กลูโคส (โมล) | ร้อยละผลได้ของ กรดมาลิก |
|--|---------------------------|-----------------------|----------------------------|
| 154.00 | 4.30 | 0.13 | 80 |
| 271.00 | 7.40 | 0.31 | 98 |
| 307.00 | 7.30 | 0.19 | 95 |
| 387.00 | 9.50 | 0.42 | 63 |
| 435.00 | 10.30 | 0.30 | 65 |
| 480.00 | 11.10 | 0.35 | 67 |
| 520.00 | 11.50 | 0.46 | 56 |

การศึกษาผลของชนิดของไอออนโลหะ โดยทำการทดสอบ 3 ชนิด คือ Fe^{2+} Mg^{2+} และ Mn^{2+} พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ Fe^{2+} ลงในอาหารจาก 0.4 เป็น 12 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยควบคุม Mg^{2+} เริ่มต้นให้อยู่ที่ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าผลได้ของกรดมาลิกเพิ่มสูงขึ้น ในขณะที่เมื่อควบคุมให้ Fe^{2+} อยู่ในปริมาณต่ำ และเพิ่มความเข้มข้นของ Mg^{2+} จาก 4 เป็น 40 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าผลได้ไม่แตกต่างกันมีนัยสำคัญ ดังนั้นจากผลการทดลองพบว่ากรดมาลิกมีร้อยละผลได้สูงสุดที่ 107 เมื่อใช้ Fe^{2+} และ Mg^{2+} 12 และ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ และเมื่อเติม Mn^{2+} ลงในอาหารที่ใช้สำหรับผลิตกรด พบว่า Mn^{2+} ทำให้ *A. flavus* ใช้กลูโคสเพิ่มขึ้นสองเท่าสูงถึง 0.49 โมล แต่ยับยั้งการสะสมของกรดมาลิก ดังนั้นผลได้ที่ 160 ชั่วโมงจึงมีค่าต่ำที่สุดเท่ากับร้อยละ 36 ดังตารางที่ 2.4

ปริมาณซังข้าวโพดด้วยก็ตาม ซังข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพแล้ว ที่ความเข้มข้น 150 กรัมต่อลิตร ประกอบด้วยกลูโคส ไซโลส เพอฟูรัล ไฮดรอกซีเมทิลเพอฟูรัล กรดฟอร์มิก และกรดอะซิติกประมาณ 96 54 0.14 2.34 0.1 และ 1.8 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับ การปรับสภาพด้วยวิธีอื่นๆ พบว่าปริมาณไฮดรอกซีเมทิลเพอฟูรัล ที่เกิดขึ้นมีค่าต่ำ เนื่องจากการนำน้ำออกจากน้ำตาล ไซโลสจะเกิดการระเหยและเอาสารประกอบพวกที่ระเหยได้ออกไปด้วย เช่น กรดอะซิติกและเพอฟูรัล เป็นต้น การที่ซังข้าวโพดที่ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกเจือจางมีปริมาณกลูโคสและไซโลสสูง อีกทั้งยังมีความเป็นกรดเล็กน้อย จึงเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดมาลิก (Zou และคณะ, 2015)

จากผลการทดสอบความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นตั้งแต่ 50 ถึง 130 กรัมต่อลิตร ตามตารางที่ 2.5 พบว่าที่ความเข้มข้น 50 ถึง 110 กรัมต่อลิตร มีน้ำตาลเหลือในระบบซึ่งส่งผลต่อการเจริญของเชื้อ แต่เมื่อปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเกิน 110 กรัมต่อลิตร การผลิตกรดมาลิกจะหยุดลงเนื่องจากถูกยับยั้งจากตัวยับยั้งอื่นๆในระบบที่มาพร้อมกับการปรับสภาพซังข้าวโพด เมื่อดูที่อัตราการใช้น้ำตาลของ *A. pullulan* CCTCCM 2012223 พบว่าที่ความเข้มข้น 110 กรัมต่อลิตร มีการผลิตกรดมาลิกได้สูงสุดคือ 15.27 ± 2.18 กรัมต่อลิตร (กรดมาลิกได้จากการย่อยโพลีมาลิกด้วยกรดซัลฟูริก) (Zou และคณะ, 2015)

ตารางที่ 2.5 ผลของความเข้มข้นของน้ำตาลจากซังข้าวโพดที่ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกต่อการผลิตกรดมาลิกในฟลาสก์ (Zou และคณะ, 2015)

| จุลินทรีย์ | ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร) | ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ (กรัมต่อลิตร) | มวลเซลล์ (กรัมต่อลิตร) | กรดมาลิก (กรัมต่อลิตร) | อัตราการผลิต (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง) | ผลได้ (กรัมต่อกรัม) |
|---|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------|---------------------------|---|------------------------|
| <i>Aureobasidium pullulan</i> CCTCCM 2012223 | 50.00 | 0.00 | 12.75 ± 0.68 | 5.90 ± 0.53 | 0.06 ± 0.005 | 0.12 |
| | 60.00 | 0.00 | 15.50 ± 0.52 | 6.03 ± 0.62 | 0.06 ± 0.006 | 0.11 |
| | 70.00 | 3.62 | 20.86 ± 0.13 | 11.42 ± 3.91 | 0.12 ± 0.040 | 0.17 |
| | 80.00 | 6.88 | 26.66 ± 0.58 | 11.58 ± 2.18 | 0.12 ± 0.022 | 0.16 |
| | 90.00 | 12.34 | 30.88 ± 0.20 | 12.66 ± 1.05 | 0.13 ± 0.010 | 0.16 |
| | 110.00 | 21.87 | 32.13 ± 0.20 | 15.27 ± 2.18 | 0.16 ± 0.023 | 0.17 |
| | 130.00 | 43.18 | 27.45 ± 0.52 | 10.29 ± 2.70 | 0.11 ± 0.028 | 0.12 |

จากการศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตกรดมาลิก ของ *A. pullulan* CCTCCM 2012223 โดยใช้แหล่งไนโตรเจนทั้งหมด 6 ชนิด ได้แก่ NH_4NO_3 NaNO_3 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ Yeast extract และเปปโตเน ความเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตร ร่วมกับ ซังข้าวโพดที่ย่อยแล้ว (คำนวณจากน้ำตาลทั้งหมด) 110 กรัมต่อลิตร KH_2PO_4 0.1 กรัมต่อลิตร $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 กรัมต่อลิตร KCl 0.5 กรัมต่อลิตร ZnSO_4 0.1 กรัมต่อลิตร และแคลเซียมคาร์บอเนต 30 กรัมต่อลิตร ค่าพีเอชเริ่มต้น 6.5 ปริมาณกรดมาลิกที่ผลิตได้แสดงดังตารางที่ 2.6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.6 แสดงปริมาณกรดมาลิกที่ *A. pullulan* CCTCCM 2012223 ผลิตได้ เมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนต่างๆ (Zou และคณะ, 2015)

| จุลินทรีย์ | ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร) | ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ (กรัมต่อลิตร) | มวลเซลล์ (กรัมต่อลิตร) | กรดมาลิก (กรัมต่อลิตร) | อัตราการผลิต (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง) | ผลได้ (กรัมต่อกรัม) |
|---|---|---------------------------------------|---------------------------|---------------------------|---|------------------------|
| <i>Aureobasidium pullulan</i> CCTCCM 2012223 | NH ₄ NO ₃ | 12.38 | 24.82 ± 0.52 | 30.01 ± 2.52 | 0.25 ± 0.021 | 0.31 |
| | NaNO ₃ | 10.56 | 25.36 ± 0.96 | 27.50 ± 2.08 | 0.23 ± 0.017 | 0.28 |
| | (NH ₄) ₂ SO ₄ | 9.98 | 25.48 ± 1.22 | 36.24 ± 0.65 | 0.30 ± 0.005 | 0.36 |
| | NH ₄ H ₂ PO ₄ | 11.58 | 27.03 ± 2.28 | 24.55 ± 0.29 | 0.20 ± 0.001 | 0.25 |
| | Yeast extract | 13.20 | 26.44 ± 0.98 | 23.83 ± 2.61 | 0.19 ± 0.016 | 0.25 |
| | Peptone | 12.76 | 26.84 ± 1.46 | 22.24 ± 1.47 | 0.17 ± 0.023 | 0.23 |
| | Control | 11.12 | 28.12 ± 3.02 | 18.41 ± 0.29 | 0.15 ± 0.002 | 0.19 |

จากตารางที่ 2.6 เมื่อใช้ (NH₄)₂SO₄ เป็นแหล่งไนโตรเจน ปริมาณกรดมาลิกที่ได้สูงสุดคือ 36.24 ± 0.65 กรัมต่อลิตร ในขณะที่ตัวควบคุมที่ไม่มีการเติมแหล่งไนโตรเจน ปริมาณกรดมาลิกที่เกิดขึ้น 18.41 ± 0.29 กรัมต่อลิตร

Zambanini และคณะ (2016) ได้ทำการศึกษาปัจจัยที่ส่งผลต่อการผลิตกรดมาลิกของ *Ustilago trichophora* TZ1 โดยใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนเริ่มต้น ปัจจัยที่ใช้ศึกษาได้แก่ ความเข้มข้นกลีเซอรอลเริ่มต้น FeSO₄ KH₂PO₄ และปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนต เป็นต้น

เริ่มต้นจากการคัดแยกสายพันธุ์ที่สามารถผลิตกรดโดยใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน โดยทำการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์บนอาหารแข็งที่มีกลีเซอรอลและเมทิลเรดเป็นอินดิเคเตอร์ พบว่าจากทั้งหมด 74 ไอโซเลต มี 7 ไอโซเลตที่สามารถใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน จากนั้นนำไอโซเลตทั้งหมดไปทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่ประกอบด้วย กลีเซอรอล และ NH₄Cl ปริมาณ 50 และ 0.8 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ จากการทดลองพบว่า *U. trichophora* (CBS 131473) มีอัตราการเจริญเติบโต และความสามารถในการผลิตมาเลตสูงสุดคือ 0.11 ต่อชั่วโมง และ 2.3 กรัมต่อลิตรที่ 216 ชั่วโมงตามลำดับ ดังนั้นจึงทำการเลือกไอโซเลตไปศึกษาปัจจัยที่เกี่ยวข้องในการผลิตกรดมาลิกต่อไป (Zambanini และคณะ, 2016)

ทำการศึกษาความเข้มข้นของกลีเซอรอลเริ่มต้น โดยความเข้มข้นของกลีเซอรอลนั้นเริ่มต้นตั้งแต่ 150 200 250 300 350 และ 450 กรัมต่อลิตร โดยพบว่าเมื่อความเข้มข้นกลีเซอรอลเพิ่มขึ้น การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ลดลง และที่ความเข้มข้นมากกว่า 300 กรัมต่อลิตร เชื่อไม่มีการเจริญเติบโตเนื่องจากถูกยับยั้งการเจริญโดยสมบูรณ์ พบว่าที่ความเข้มข้น 150 กรัมต่อลิตรมีอัตราการผลิตกรดมาลิกสูงสุดที่ 0.50 ± 0.08 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง แต่ที่ความเข้มข้น 250 กรัมต่อลิตรได้ปริมาณกรดมาลิกสูงสุดที่ 196 ± 5 กรัมต่อลิตร และมีค่าผลได้สูงสุดคือ 0.08 ± 0.02 กรัม (มาลิก) ต่อกรัม (กลีเซอรอล) (เท่ากับ 0.57 ± 0.01 โมล (มาลิก) ต่อโมล (กลีเซอรอล)) จากผลทดลองพบว่า

เมื่อความเข้มข้นของกลีเซอรอลสูงขึ้น อัตราการผลิตกรดมาลิกต่อกรัมมวลเซลล์จะสูงขึ้น แต่ในทาง
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับบริการวิชาการเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นอญูญาติเนาไปไซบะระยชนดานการคา
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปฏิบัติเป็นไปได้ยากเนื่องจากความแตกต่างของของเหลวภายในเซลล์ ซึ่งจะส่งผลต่อปริมาณมวลเซลล์ของ *U. trichophora* TZ1 (Zambanini และคณะ, 2016)

เมื่อศึกษาผลของ FeSO_4 และ KH_2PO_4 ต่อการผลิตกรดที่ความเข้มข้น 0.125 0.25 0.5 และ 1.0 กรัมต่อลิตร พบว่าความเข้มข้นต่างๆที่ใช้ ไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์หรือการผลิตมาเลตใน *U. trichophora* TZ1 (Zambanini และคณะ, 2016) เมื่อศึกษาผลของแคลเซียมคาร์บอเนตต่อการผลิตกรดมาลิก พบว่าเมื่อใช้แคลเซียมคาร์บอเนต 33 กรัมต่อลิตร ในอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยง ได้ปริมาณมาเลตสูงที่สุดคือ 5.3 ± 0.3 กรัมต่อลิตร เมื่อผ่านไป 96 ชั่วโมง และค่าพีเอชที่ได้มีค่าคงที่ ข้อดีของแคลเซียมคาร์บอเนตนอกจากทำให้ค่าพีเอชในอาหารคงที่แล้ว ยังช่วยเพิ่มปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ เนื่องจากการเปลี่ยนไพรูเวทเป็นมาเลตต้องอาศัยคาร์บอนไดออกไซด์เป็นสารตั้งต้นร่วม พบว่าเมื่อกรดมาลิกทำปฏิกิริยาร่วมกับแคลเซียมคาร์บอเนตจะอยู่ในรูปของไบคาร์บอเนต และเมื่อปริมาณไบคาร์บอเนตเพิ่มขึ้นจะช่วยใช้เอนไซม์ไพรูเวตคาร์บอกซิเลสเปลี่ยนไพรูเวทเป็นออกซาลอะซิเตทมากขึ้น (Zambanini และคณะ, 2016)

Knuf และคณะ (2013) ได้ทำการศึกษาการผลิตกรดมาลิกของ *Aspergillus oryzae* NRRL 3488 เมื่อมีการจำกัดปริมาณแหล่งไนโตรเจน ทำการทดสอบโดย เลี้ยงเชื้อบนอาหารสำหรับการผลิตสปอร์ (Cove-N-Gly) (Vongsangnak และคณะ; 2011) ในเพลทที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน หลังจากนั้นใช้สารละลาย Tween 80 ร้อยละ 0.01 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เพื่อถ่ายสารละลายสปอร์ลงในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ (G2-Gly) (Vongsangnak และคณะ; 2011) ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต 100 กรัมต่อลิตร เลี้ยงหัวเชื้อที่สภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และถ่ายหัวเชื้อที่เตรียมได้ร้อยละ 10 โดยปริมาตรลงในอาหารสำหรับการผลิตกรด (MAF3) ที่ประกอบด้วย กลูโคส KH_2PO_4 K_2HPO_4 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ NaCl และแคลเซียมคาร์บอเนต ปริมาณ 50.00 0.15 0.15 0.10 0.10 0.005 0.005 และ 100.00 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ อีกทั้งยังเติมกรดพลูโรนิก (pluronic acid) ปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงในอาหาร (กรดพลูโรนิกเป็นสารช่วยลดแรงตึงผิว เพื่อช่วยควบคุมแรงเฉือนและลดการเกิดโฟมในอาหาร) และจำกัดปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต $((\text{NH}_4)\text{SO}_4)$ และแบคโตเปปโตนที่ 1.40 และ 6.00 กรัมต่อลิตรตามลำดับ โดยทำการทดลอง 4 ชั่วโมง ผลการทดลองที่ได้เป็นไปตามตารางที่ 2.7

ตารางที่ 2.7 ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตกรดมาลิกของ *A. oryzae* NRRL 3488 เมื่อใช้กลูโคสเริ่มต้น 50 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน (Knuf และคณะ, 2013)

| แหล่งไนโตรเจน | ความเข้มข้นที่ใช้ (กรัมต่อลิตร) | อัตราการเจริญจำเพาะ สูงสุด (ต่อชั่วโมง) | อัตราการใช้กลูโคส (มิลลิโมลต่อลิตรต่อชั่วโมง) | กรดมาลิก (กรัมต่อลิตร) | ผลได้ (โมลต่อโมล) |
|------------------|------------------------------------|--|--|---------------------------|----------------------|
| แอมโมเนียมซัลเฟต | 1.40 | 0.21 ± 0.05 | 3.71 ± 0.44 | 22.27 ± 0.46 | 0.34 ± 0.06 |
| แบคโตเปปโตน | 6.00 | 0.23 ± 0.01 | 8.10 ± 0.81 | 30.27 ± 1.05 | 0.33 ± 0.05 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากตารางที่ 2.7 แสดงให้เห็นว่าเมื่อใช้เปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจน ปริมาณกรดมาลิกที่ *A. oryzae* NRRL 3488 ผลิตได้มีปริมาณ 30.27 ± 1.05 กรัมต่อลิตร ซึ่งมากกว่าการใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน แต่จากผลได้กลับน้อยกว่าเมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเล็กน้อย (Knuf และคณะ, 2013)

2.5 การประยุกต์ใช้กรดมาลิก

กรดมาลิกนั้นถูกนำไปใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น การสังเคราะห์พอลิเมอร์ อุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม ใช้เป็นสารคีเลตสำหรับช่วยจับไอออนของโลหะในอาหาร อุตสาหกรรมการแพทย์ และอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง

2.5.1 การสังเคราะห์พอลิเมอร์

กรดมาลิกเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์พอลิเมอร์ที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ หรือเรียกว่า พลาสติกชีวภาพ (Bioplastic) ช่วยลดปัญหามลพิษในสิ่งแวดล้อม (Strauss และคณะ, 1985) วัสดุธรรมชาติที่สามารถนำมาผลิตเป็นพลาสติกชีวภาพมีหลายชนิด เช่น เซลลูโลส คอลลาเจน คาเซอีน โพลีเอสเทอร์ แป้ง โปรตีนจากถั่ว และข้าวโพด เป็นต้น และในบรรดาวัสดุธรรมชาติทั้งหลาย แป้งนับว่าเหมาะสมที่สุดเพราะมีจำนวนมากและราคาถูก เนื่องจากสามารถหาได้จากพืชชนิดต่างๆ เช่น ข้าวโพด ข้าวสาลี มันฝรั่ง มันเทศ มันสำปะหลัง เป็นต้น แต่พลาสติกชีวภาพที่ผลิตจากแป้งจะมีข้อจำกัดเพราะจะเกิดการพองตัวและเสีรูปร่างเมื่อได้รับความชื้น ดังนั้นจึงได้มีการใช้เชื้อจุลินทรีย์เข้าไปย่อยสลายแป้ง แล้วเปลี่ยนแป้งให้กลายเป็นโมโนเมอร์ (monomer) หรือการหมักให้เป็นกรดอินทรีย์ชนิดต่างๆ เช่น กรดแลคติก และ กรดมาลิก เป็นต้น จากนั้นนำไปผ่านกระบวนการ polymerization เพื่อทำให้กรดอินทรีย์เชื่อมกันเป็นสายยาวที่เรียกว่า โพลีเมอร์ (polymer) (กรมส่งเสริมอุตสาหกรรม, 2009)

2.5.2 อุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม

กรดมาลิกถูกใช้เป็นสารปรับสภาพความเป็นกรดในอาหารและเครื่องดื่ม โดยกรดมาลิกจะมีรสชาติเปรี้ยวที่ชัดเจนกว่าและมีความคงอยู่ของรสชาตินานกว่ากรดซิตริกหรือที่เรียกอีกชื่อว่ากรดมะนาว จึงทำให้มีการนำกรดมาลิกมาใช้เพื่อผลิตอาหารและเครื่องดื่มหลายชนิด เช่น น้ามะเขือเทศเข้มข้น แยม ซอสแอปเปิ้ล ลูกแพร์กระป๋องและน้ำสับปะรด เป็นต้น (Lumyong และคณะ, 1991)

2.5.3 คุณสมบัติการเป็นสารคีเลต

สารคีเลตจะมีบทบาทสำคัญในอาหารคือ จะทำปฏิกิริยากับโลหะและไอออนของโลหะอัลคาไลน์เอิร์ท (alkaline earth metals) ที่ปะปนอยู่ในอาหารเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนโดยวิธีนี้จะทำให้โลหะหรือไอออน ที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาต่าง ๆ ที่ทำให้อาหารเสื่อมคุณภาพลดน้อยลง เช่น ช่วยรักษาเสถียรภาพของสี กลิ่น รส และเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์อาหาร โลหะหลายตัวที่อยู่ในไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งยังมีให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สภาวะคีเลต (chelated state) ในธรรมชาติ เช่น แมกนีเซียมในคลอโรฟิลล์ ทองแดง สังกะสี และแมงกานีสในเอนไซม์หลายชนิด เมื่อโลหะไอออนเหล่านี้ถูกปลดปล่อยออกมาโดยปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสหรือปฏิกิริยาการแตกหัก (degradation reactions) มันจะสามารถทำปฏิกิริยาต่าง ๆ ทำให้เกิดการเปลี่ยนสี เกิดกลิ่นหืน ความขุ่น และการเปลี่ยนแปลงกลิ่นรสของอาหาร สารคีเลตจึงได้ถูกนำมาใช้เพื่อให้เกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับโลหะไอออน และช่วยทำให้อาหารคงคุณภาพไว้ได้

สารคีเลตที่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารส่วนใหญ่เป็นสารที่ได้จากธรรมชาติ ได้แก่ กรดโพลีคาร์บอกซิลิก (polycarboxylic acid) เช่น กรดซิตริก กรดมาลิก กรดทาร์ทาริก กรดออกซาลิก และกรดซัคซินิก กรดโพลีฟอสฟอริก เช่น อะดีโนซีนไตรฟอสเฟตและไพโรฟอสเฟต และโมเลกุลขนาดใหญ่ (macro molecules) เช่น พอร์ไฟรินและโปรตีน เป็นต้น

2.5.4 อุตสาหกรรมการแพทย์

กรดมาลิกถูกนำมาใช้ในการรักษาผู้ป่วยโรคตับและผู้ป่วยที่มีอาการ hyperammonemia หรือโรควงจรยูเรียบกพร่อง (Urea cycle defect) ผู้ป่วยที่เป็นโรคนี้จะมีอาการแอมโมเนียในเลือดสูง เป็นผลทำให้เลือดมีความเป็นกรดสูง (ประนุท ต้นไพบูลย์, 2549) อาการเหล่านี้อาจเป็นอาการแทรกซ้อนที่เกิดจากโรคตับแข็ง (วิระพล ภิมาลย์, 2555) โดยจะใช้กรดมาลิกเป็นส่วนประกอบของกรดอะมิโนสำหรับการนำไปฉีดเข้าเส้นเลือดของผู้ป่วย (Peleg และคณะ, 1988)

2.5.5 อุตสาหกรรมการผลิตเครื่องสำอาง

เครื่องสำอางได้รับความนิยมมากในสังคมปัจจุบัน จึงมีการเติมสารหลายชนิดลงไป ในเครื่องสำอาง ซึ่งอาจเป็นสารธรรมชาติหรือสารสังเคราะห์ จุดประสงค์หลักคือ สบรื้อรอยเหี่ยวย่นบนใบหน้า เพื่อหวังให้ผิวพรรณดูดีขึ้น เป็นการส่งเสริมบุคลิกภาพของตน และสารที่เป็นที่นิยมผสมลงไป ในเครื่องสำอางมากที่สุดคือสาร AHA (Alphahydroxy Acid) เป็นสารที่พบได้ในผลไม้และพืชผักหลายชนิด สาร AHA มีหลายชนิด สามารถสกัดได้จากผลไม้ เช่น กรดไกลโคลิก (Glycolic acid) ซึ่งได้มาจากอ้อย กรดแล็กติก (Lactic acid) ได้มาจากนมเปรี้ยว กรดมาลิก (Malic acid) ได้มาจากแอปเปิ้ล กรดทาร์ทาริก (Tartaric acid) ได้มาจากมะขามหรือไวน์ที่บ่มนานๆ กรดซิตริก (Citric acid) ได้มาจากผลไม้จำพวกส้มชนิดต่าง ๆ (ประวิตร พิศาลบุตร, 2549)

การใช้สาร AHA จุดประสงค์ก็เพื่อนำมาใช้ในการรักษาโรคผิวหนังต่าง ๆ มากมาย เช่น โรคผิวหนัง (Ichthyosis) โรคผิวหนังแข็งนูน โรคผิวหนังแข็งนูน เป็นสะเก็ดจากแสงแดด (Actinic Keratosis) รอยกระ สิวดำ มีลักษณะเป็นปื้นใหญ่ ซึ่งมีสาเหตุจากแสงแดด (Solar Lentigo) การลอกผิว (Peeling) รักษาหูด รอยเหี่ยวย่นจากแสงแดด ในวงการเครื่องสำอางจึงได้มีการพัฒนาโดยเติมสารตัวนี้ลงในเครื่องสำอาง โดยมีวัตถุประสงค์ทำให้ผิวพรรณดูอ่อนนุ่ม ลดรอยเหี่ยวย่น ซึ่งกลไกการออกฤทธิ์ของสาร AHA คือควบคุมสมดุลของความชุ่มชื้นของผิวให้เป็นปกติ ซึ่งโดยปกติผิวหนังจะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์การเขียนในเชิงวิชาการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้เผยแพร่ไปใช้ประโยชน์ทางการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มีกลไกควบคุมสมดุลของความชุ่มชื้น และถ้าความสมดุลเหล่านี้เสียไปจะเกิดริ้วรอยเหี่ยวย่น นอกจากนี้สาร AHA ยังช่วยกระตุ้นเซลล์ที่ตายแล้วแต่ยังจับกันแน่นให้หลุดออก ทำให้มีการสร้างเซลล์ใหม่ทดแทน ทำให้ผิวหนังดูสดใส (ธัมมทิวต์ นรารัตน์วันชัย, 2555)

2.6 การจำแนกชนิดของแบคทีเรีย

2.6.1 ลักษณะทางด้านสัณฐานวิทยา (Morphological characteristics)

โดยสังเกตได้จากขนาด รูปร่าง โครงสร้างของ เนื่องจากเซลล์นั้นมีขนาดเล็กมากเป็นหน่วยไมโครเมตร การศึกษาต้องใช้กล้องจุลทรรศน์มีกำลังขยายประมาณ 1000 เท่า นอกจากนี้ยังมีการใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนที่สามารถให้รายละเอียดมากขึ้น และใช้เทคนิคอื่นๆเพื่อตรวจสอบจุลินทรีย์ (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ, 2554)

2.6.2 องค์ประกอบทางเคมีของเซลล์ (Chemical composition)

โดยศึกษาได้จากผนังเซลล์ของแบคทีเรีย เนื่องจากองค์ประกอบของผนังเซลล์แบคทีเรียนั้นแตกต่างกัน เช่น แบคทีเรียแกรมลบมีลิโปโพลิแซคคาไรด์ที่ผนังเซลล์แต่ไม่พบในแบคทีเรียแกรมบวก เป็นต้น (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ, 2554)

2.6.3 ลักษณะของการเลี้ยงแบคทีเรีย (Bacteria Cultural characteristics)

โดยศึกษาจากชนิดของสูตรอาหารที่มีองค์ประกอบของสารอาหารแตกต่างกัน เนื่องจากแบคทีเรียนั้นมีความต้องการสารอาหารในการเจริญที่แตกต่างกันรวมทั้งสภาพแวดล้อมในการเลี้ยง เช่น อุณหภูมิ แสงสว่าง และอากาศ เป็นต้น (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ, 2554)

2.6.4 ลักษณะทางเมแทบอลิซึม (Metabolic characteristics)

โดยศึกษาเมแทบอลิซึมของแบคทีเรียที่แตกต่างกัน เช่น วิธีการสังเคราะห์องค์ประกอบของเซลล์ ที่มาจากปฏิกิริยาทางเคมีของการทำงานของเอนไซม์ เป็นต้น (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ, 2554)

2.6.5 ลักษณะทางด้านพันธุกรรม (Genetic characteristics)

2.7.5.1 สารพันธุกรรมคือดีเอ็นเอ 2 สาย ใช้ในการจัดจำแนกชนิดของจุลินทรีย์จากองค์ประกอบของเบสดีเอ็นเอ (DNA base composition) ดีเอ็นเอ นั้นประกอบด้วยคู่เบส คือ อะดีนีน (A) คู่กับไทมีน (T) และ กวานีน (G) คู่กับไซโทซีน (C) จุลินทรีย์แต่ละชนิดจะมีความแตกต่างกันของจำนวนนิวคลีโอไทด์เบสในดีเอ็นเอ โดยคำนวณร้อยละของกวานีนและไซโทซีนรวมกัน โดยในสปีชีส์ที่ใกล้เคียงกันจะมีร้อยละของกวานีนและไซโทซีนคล้ายกันมาก และถ้าร้อยละของกวานีนและไซโทซีนแตกต่างกันมากก็แสดงถึงความสัมพันธ์ของจุลินทรีย์ที่ไม่ใกล้เคียงกัน แต่ก็มีความไม่แน่นอนอันเกิดขึ้นได้ คำว่ากรรมใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เพราะจุลินทรีย์ที่ไม่มีความสัมพันธ์กันเลยอาจมีร้อยละของกวานีนและไซโทซีนที่คล้ายกันได้ (นางลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ, 2554)

2.6.5.2 ลำดับ (sequence) ของนิวคลีโอไทด์เบสในดีเอ็นเอ ซึ่งจำเพาะกับจุลินทรีย์แต่ละชนิด เป็นหลักที่สำคัญที่สุดในการจำแนกชนิดของจุลินทรีย์ เพราะมีความแม่นยำ (นางลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ, 2554) มีหลักการดังนี้

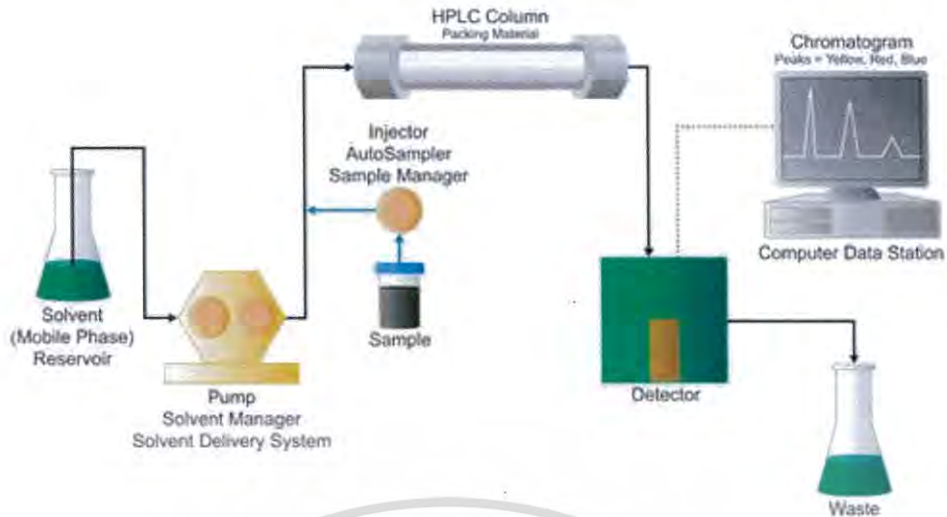
2.6.5.2.1 ความคล้ายกันของดีเอ็นเอ (DNA homology) ดีเอ็นเอสายคู่เมื่อได้รับความร้อน ความร้อนจะเข้าไปทำลายพันธะไฮโดรเจน ส่งผลให้สายของดีเอ็นเอที่เข้าคู่กันแยกออกจากกัน และเมื่อทิ้งไว้ให้เย็นดีเอ็นเอจะสามารถกลับมาเข้าคู่กันได้อีก โดยใช้หลักการจับคู่เบสของดีเอ็นเอ จึงนำเอาหลักการนี้มาหาความคล้ายกันของลำดับเบสของดีเอ็นเอ ซึ่งหากสิ่งมีชีวิตมีความคล้ายคลึงกันมาก ดีเอ็นเอทั้งสองจะสามารถจับคู่ (hybridize) ได้ ดังนั้นมีการนำเอาดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตทั้งสองชนิดมาให้ความร้อนเพื่อให้ดีเอ็นเอสายคู่แยกออก (denature) แล้วนำเอาสายเดี่ยวนั้นมาผสมกัน ถ้าสิ่งมีชีวิตทั้งสองนั้นมีความใกล้เคียงกัน ก็จะเกิดการจับคู่ของดีเอ็นเอ (heteroduplex) ถ้าสิ่งมีชีวิตทั้งสองนั้นไม่มีความใกล้เคียงกัน ก็จะไม่เกิดการจับคู่ของดีเอ็นเอ วิธีนี้เรียกว่า nucleic hybridization (นางลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ, 2554)

2.6.5.2.2 ความคล้ายคลึงของไรโบโซมัลอาร์เอ็นเอ (Ribosomal RNA homology experiments and ribosomal RNA oligonucleotide cataloging) แม้ว่าสิ่งมีชีวิตทั้งสองจะมีความใกล้เคียงทางดีเอ็นเอที่ไม่มากพอที่จะเข้าคู่กันได้ แต่ก็ยังคงมีไรโบโซมที่มีความคล้ายกัน ซึ่งไรโบโซมนั้นเป็นโครงสร้างเล็กภายในเซลล์ที่ทำหน้าที่สังเคราะห์โปรตีน ไรโบโซมประกอบด้วยโปรตีนและไรโบโซมัลอาร์เอ็นเอ (rRNA) โดยไรโบโซมัลอาร์เอ็นเอนั้นสร้างมาจากดีเอ็นเอพบว่ามี ความคงตัวในลำดับของนิวคลีโอไทด์ของ rRNA สูงมาก ลำดับนิวคลีโอไทด์มีการเปลี่ยนแปลงน้อยมากแม้ว่าจะมีวิวัฒนาการมานาน ซึ่งจะแสดงให้เห็นว่าแม้สิ่งมีชีวิตทั้งสองจะมีความใกล้เคียงทางดีเอ็นเอที่ไม่มากพอที่จะเข้าคู่กันได้ แต่ก็ยังคงมีลำดับนิวคลีโอไทด์ในไรโบโซมัลอาร์เอ็นเอที่คล้ายกัน จึงใช้ความคล้ายคลึงนี้เป็นตัวชี้วัดความใกล้ชิดของสิ่งมีชีวิต และความคล้ายคลึงของ rRNA และ RNA oligonucleotide cataloging เป็นวิธีการที่ใช้ในการหาความคล้ายกันของไรโบโซมัลอาร์เอ็นเอของสิ่งมีชีวิต (นางลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ, 2554)

2.7 High performance liquid chromatography (HPLC)

HPLC เป็นเครื่องมือที่ใช้ในการแยกสารผสมในสถานะของเหลว โดยใช้ความแตกต่างอัตราการไหลของเฟส 2 เฟสคือ เฟสคงที่ (Stationary phase) และเฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) องค์ประกอบที่สำคัญสำหรับการแยกสารโดยการใช้เครื่องมือ HPLC นั้นได้แก่ เฟสเคลื่อนที่ ตัวทำละลาย ปัมป์ คอลัมน์ ระบบการฉีดตัวอย่าง และตัวตรวจจับสาร ดังรูปที่ 2.10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.8 ระบบการทำงานของเครื่อง High performance liquid chromatography
ที่มา : http://www.waters.com/waters/en_TH/Identifying-and-Quantitating-Compounds/nav.htm?cid=10049064&locale=en_TH

2.7.1 เฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) และตัวทำละลาย

รีเซอวัวร์ (Reservoir) จะทำหน้าที่บรรจุกตัวทำละลาย โดยหากตัวทำละลายมีปริมาตรเท่ากับหรือมากกว่า 500 มิลลิลิตร นั้นจะต้องกำจัดแก๊สและสิ่งสกปรกที่ละลายอยู่ในตัวทำละลาย เพราะแก๊สที่ละลายมีผลต่ออัตราการไหล ทำให้อัตราการไหลเกิดความคลาดเคลื่อน รวมถึงสิ่งสกปรกและฟองอากาศนั้นจะไปรบกวนการทำงานของเครื่องตรวจจับสัญญาณทำให้ประสิทธิภาพของเครื่องตรวจจับลดลง โดยเครื่องไล่แก๊สนั้นจะประกอบด้วยระบบปั๊มสุญญากาศ ระบบคลื่น อุปกรณ์สำหรับคนและให้ความร้อน มีการใช้แก๊สเฉื่อยที่ไม่ละลายในเฟสเคลื่อนที่ไล่แก๊สที่ละลายอยู่ ระบบกรองมีความสำคัญเนื่องจากบ่อยครั้งที่สิ่งสกปรกหรืออนุภาคของสารละลายเข้าไปอุดตัน ทำให้ปั๊ม หัวฉีด และคอลัมน์เสียหาย จึงมีระบบกรองเพื่อป้องกันปัญหาเหล่านี้โดยสารละลายจะต้องผ่านระบบกรองที่มีรูพรุนและสุญญากาศก่อน ในบางครั้งเครื่อง HPLC มีรีเซอวัวร์สองอันหรือมากกว่า เนื่องจากตัวทำละลายนั้นอาจมีชนิดเดียว สองชนิด หรือมากกว่า และเฟสเคลื่อนที่ที่มีตัวทำละลายสองชนิดหรือมากกว่า จะมีการแยกสารที่ต้องการด้วยความแตกต่างของขั้ว จึงต้องการรีเซอวัวร์เพื่อใส่ตัวทำละลาย (Skoog และคณะ, 2007)

2.7.2 เครื่องสูบ (Pump)

เป็นอุปกรณ์ที่ใช้สูบเฟสเคลื่อนที่เป็นของเหลวให้เข้าสู่คอลัมน์ โดยมีคุณสมบัติคือ ต้องมีความดันปกติอยู่ที่ 1000-6000 psi (lb/in²) สามารถปล่อยสารได้อย่างเป็นอิสระ มีอัตราการไหลอยู่ในช่วง 0.1-10 มิลลิลิตรต่อนาที มีอัตราการแพร่ไม่น้อยกว่า 0.5% ทนต่อการกัดกร่อนของตัวทำละลาย

เครื่องสูบนี้นิยม ได้แก่

1) แบบไซริงค์ ใช้กับคอลัมน์ขนาดเล็ก ใช้การหมุนของสกรูในก้านลูกสูบเพื่อควบคุมปริมาตรในการสูบของลูกสูบ

2) แบบแทนทีของเหลว สามารถใช้สูบของเหลวในปริมาณที่มากได้ โดยการควบคุมเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อผู้ดูแลเห็นไปขอขะเขย่งที่นั่นก็ทำไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

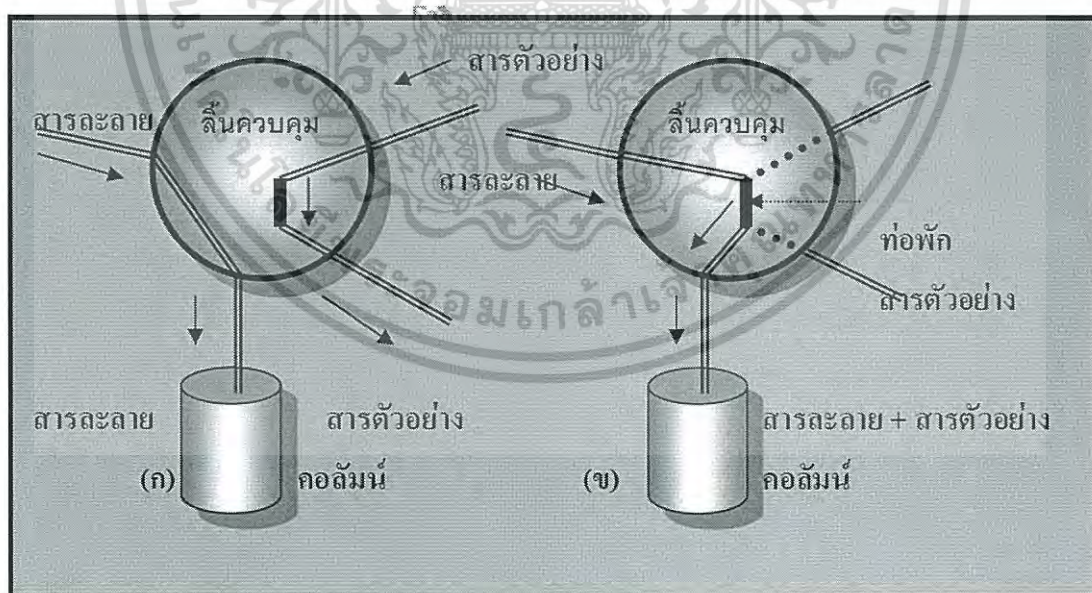
ความเร็วของมอเตอร์ที่หมุนก้านลูกสูบหรือควบคุมระยะชักลูกสูบ

3) แบบความดันคงที่ ใช้ความดันของแก๊สเฉื่อยควบคุมการไหลของของเหลวเข้าสู่คอลัมน์แรงดันสูงที่สร้างขึ้นโดยเครื่องสูบนั่นจะไม่ทำให้เกิดอันตรายจากการระเบิด เนื่องจากไม่เกิดการบีบอัดของของเหลว ดังนั้นการระเบิดของส่วนประกอบจะเกิดขึ้นจากการรั่วไหลของตัวทำละลายเท่านั้น ซึ่งการรั่วไหลของตัวทำละลายก็อาจก่อให้เกิดประกายไฟและเป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม (Skoog และคณะ, 2007)

2.7.3 ระบบการฉีดตัวอย่าง

เป็นอุปกรณ์ที่ใช้ควบคุมปริมาตรของสารตัวอย่างที่เข้าสู่คอลัมน์ บ่อยครั้งที่ตัวอย่างที่แพร่เข้าไปในคอลัมน์นั้นส่งผลต่อความแม่นยำในการวัดของเครื่อง HPLC ซึ่งตัวอย่างที่แพร่นั้นทำให้การฉีดตัวอย่างใช้เวลานานและแถบที่ได้ออกมาไม่มีประสิทธิภาพ ดังนั้นจึงต้องใช้ตัวอย่างในปริมาณที่น้อยมากๆ เพื่อลดปัญหาและสามารถใส่ตัวอย่างได้โดยไม่ต้องลดความดันในระบบ โดยอุปกรณ์ที่นิยมใช้ฉีดตัวอย่างสำหรับ HPLC คือ “Sampling loop” ดังรูปที่ 2.11 ซึ่งเป็นอุปกรณ์ที่รวมการใส่ของเหลวและการแลกเปลี่ยนเข้าด้วยกันโดยตัวอย่างที่ฉีดเข้าไปจะมีท่อพักที่มีปริมาตรคงที่ จากนั้นจึงหมุนลิ่มให้ตัวทำละลายเป็นตัวนำของเหลวเข้าสู่คอลัมน์ โดยสามารถใส่ตัวอย่างได้ตั้งแต่ 1–1000 ไมโครลิตร หรือมากกว่า

HPLC ในปัจจุบันมักทำระบบฉีดเป็นแบบอัตโนมัติโดยเราสามารถนำตัวอย่างเข้าในเครื่อง HPLC ได้โดยการใส่ตัวอย่างไว้ในขวดแก้ว (Vials) หรือจานขนาดเล็ก (Microtiter plates) ซึ่งปริมาตรที่ใส่ตัวอย่างจะเริ่มที่ 1 ไมโครลิตร หรือมากกว่า 1000 ไมโครลิตร (Skoog และคณะ, 2007)



รูปที่ 2.9 ระบบการฉีดตัวอย่างแบบ “Sampling loop”

ที่มา : <http://home.kku.ac.th/chuare/12/HPLC.pdf>

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.7.4 คอลัมน์

คอลัมน์ของ HPLC จะทำจากแก้ว เหล็กกล้าไร้สนิมผิวเรียบ โพลีเมอร์ เช่น โพลีอีเทอร์ อีเทอร์คีโตน (Polyetheretherketone; PEEK) เนื่องจากหาง่าย คอลัมน์มีความยาวตั้งแต่ 10-150 เซนติเมตร มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายในคอลัมน์ 3 หรือ 5 มิลลิเมตร และตัวดูดซับภายในคอลัมน์ มีขนาดประมาณ 3-5 ไมโครเมตร คอลัมน์ส่วนใหญ่ที่นิยมใช้ มีความยาวประมาณ 10-15 เซนติเมตร มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายในคอลัมน์ 4.6 มิลลิเมตร และตัวดูดซับภายในคอลัมน์มีขนาด 5 ไมโครเมตร

ในปี 1980 ใช้คอลัมน์แบบขนาดเล็กที่มีความยาว 3-7.5 เซนติเมตร มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายในคอลัมน์ 1-4.6 มิลลิเมตร ตัวดูดซับภายในคอลัมน์มีขนาดประมาณ 3-5 ไมโครเมตร ใช้ปริมาตรตัวทำละลายน้อยและสามารถแยกสารได้รวดเร็วในระยะเวลาเพียง 15 วินาที แต่มีข้อจำกัดคือต้องใช้ตัวทำละลายที่บริสุทธิ์ซึ่งมีราคาแพง

การ์ดคอลัมน์ (Guard columns) เป็นอุปกรณ์ที่ยืดอายุการใช้งานของคอลัมน์ โดยการด์ คอลัมน์จะทำหน้าที่ขจัดอนุภาคสิ่งปนเปื้อนที่ปะปนอยู่ในตัวทำละลายก่อนจะเข้าสู่คอลัมน์เพื่อแยก สารละลายที่ต้องการต่อไป การ์ดคอลัมน์มีลักษณะคล้ายคอลัมน์แต่จะมีตัวดูดซับภายในคอลัมน์ขนาดใหญ่กว่า มีแรงดันน้อยกว่า และเมื่อการ์ดคอลัมน์เกิดการปนเปื้อนก็จะนำตัวดูดซับที่ปนเปื้อนออก และแพ็คตัวดูดซับใหม่ (Skoog และคณะ, 2007)

2.7.5 ชนิดของคอลัมน์ (Types of column packings)

โดยพื้นฐานของคอลัมน์มี 2 ชนิดคือ

1) Pellicular particle มีลักษณะกลม ไม่มีรูพรุน ทำมาจากเม็ดแก้วหรือเม็ดโพลี เมอร์ มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 30-40 ไมโครเมตร เคลือบด้วยซิลิกา โพลีสไตรีนไดไวนิลเบนซีน หรือเรซินแลกเปลี่ยนประจุ ใช้สำหรับแยกโปรตีนและชีวโมเลกุลขนาดใหญ่

2) Porous particle ประกอบด้วยอนุภาคที่มีรูพรุน มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3-10 ไมโครเมตร มีขนาดเล็กกว่าชนิด Pellicular particle เพื่อให้มีการกระจายตัวของสารอย่างทั่วถึง คอลัมน์ชนิดนี้ทำจากซิลิกา โพลีสไตรีนไดไวนิลเบนซีน หรือเรซินแลกเปลี่ยนประจุ นิยมใช้ซิลิกามาก ที่สุด เพราะซิลิกามีความสามารถในการเกาะกลุ่มที่ดีและสามารถสร้างพันธะจนกลายเป็นแผ่นฟิล์ม ชีวภาพ

2.7.6 ตัวตรวจจับ (Detectors)

มีหน้าที่ตรวจวัดปริมาณของสารที่ต้องการเพื่อส่งเข้าเครื่องบันทึกผลทำการบันทึกค่าและ แสดงผลเป็นกราฟแสดงผลของสารประเภทต่างๆ โดยพื้นฐานของตัวตรวจจับมี 2 ชนิดคือ

1) Bulk-property detectors ทำงานโดยใช้คุณสมบัติของเฟสเคลื่อนที่ เช่น ค่าคงที่ของกระแสไฟฟ้า ความหนืด ดัชนีหักเห เป็นต้น

2) Solute-property detectors ทำงานโดยใช้คุณสมบัติการตอบสนองต่อตัวทำ ละลาย ไม่เกี่ยวข้องกับเฟสเคลื่อนที่ เช่น การดูดกลืนรังสียูวี ฟลูออเรสเซนซ์ การแพร่ของกระแสไฟ เป็นต้น (Skoog และคณะ, 2007)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

- 3.1.1 ขวดรูปชมพู่ ขนาด 125 มิลลิลิตร
- 3.1.2 ปีกเกอร์
- 3.1.3 กระบอกตวง
- 3.1.4 ปีเปิด
- 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 ซ้อนตักสาร
- 3.1.12 ขวดไวแอล
- 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) ยี่ห้อ 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 innova4230 ประเทศแคนาดา
- 3.1.19 เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Mettler Toledo รุ่น PG500 ประเทศสวิสเซอร์แลนด์
- 3.1.20 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Denver Instrument รุ่น SI-234 ประเทศเยอรมัน
- 3.1.21 ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air flow) ยี่ห้อ Issco รุ่น BV T123 สหรัฐอเมริกา
- 3.1.22 ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) ยี่ห้อ Contherm รุ่น Polar 1000 ประเทศนิวซีแลนด์
- 3.1.23 ตู้อบลมร้อน (Hot air oven) ยี่ห้อ Shel Lab รุ่น 1375 FX forced air oven สหรัฐอเมริกา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 3.1.24 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) ยี่ห้อ HERMLE Labortechnik GmbH รุ่น Z326K ประเทศเยอรมัน
- 3.1.25 เครื่อง Spectrophotometer ยี่ห้อ SHIMADZU รุ่น UV-1201V ประเทศญี่ปุ่น
- 3.1.26 เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ยี่ห้อ SHIMADZU รุ่น LC-20A ประเทศญี่ปุ่น
- 3.1.27 กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงธรรมดา (Compound Light Microscope) ยี่ห้อ OLYMPUS

3.2 สารเคมี

- 3.2.1 Glucose ($C_6H_{12}O_6$) ยี่ห้อ Huakang ประเทศจีน
- 3.2.2 Xylose ($C_5H_{10}O_5$) ยี่ห้อ Huakang ประเทศจีน
- 3.2.3 Yeast extract ยี่ห้อ Scharlau Microbiology ประเทศอังกฤษ
- 3.2.4 Ammonium chloride (NH_4Cl) ยี่ห้อ Ajax Finechem Pty ประเทศออสเตรเลีย
- 3.2.5 Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4) ยี่ห้อ CARLO ERBA Reagents ประเทศอิตาลี
- 3.2.6 Magnesium sulfate heptahydrate ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) ยี่ห้อ Fluka Chemika ประเทศสวิสเซอร์แลนด์
- 3.2.7 Calcium carbonate ($CaCO_3$) ยี่ห้อ Ajax Finechem Pty ประเทศออสเตรเลีย
- 3.2.8 Agar
- 3.2.9 Alcohol 70%
- 3.2.10 Alcohol 95%
- 3.2.11 Ethyl acetate
- 3.2.12 Organic acid (Malic acid)
- 3.2.13 TE (10mM Tris HCl, 1mM EDTA pH 8.0)
- 3.2.14 10% Sodium dodecyl sulfate (SDS)
- 3.2.15 TE/Lysozyme (1 : 1)
- 3.2.16 Protease K 1mg/ml (เก็บที่ $-20^{\circ}C$)
- 3.2.17 5M NaCl
- 3.2.18 CTAB/NaCl solution (0.7M NaCl, 10% (w/v) CTAB (Cetyltrimethylammonium - bromide))
- 3.2.19 Chloroform/Isoamyl Alcohol (24 : 1) (CI)
- 3.2.20 Phenol/Chloroform/Isoamyl Alcohol (25 : 24: 1) (PCI)
- 3.2.21 Isopropanol
- 3.2.22 70% ethanol
- 3.2.23 RNase solution (dissolve in 10 mg RNase/ml in 10 mM /Tris HCl, 15 mM NaCl (pH 7.5))

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 3.2.24 Ethanol 99.5%
- 3.2.25 3M sodium acetate buffer (pH 5.0)
- 3.2.26 10X Standard Taq Reaction Buffer
- 3.2.27 10 mM dNTPs
- 3.2.28 10 μ M Forward Primer ที่ใช้คือ 8F
- 3.2.29 10 μ M Reverse Primer ที่ใช้คือ 1492R
- 3.2.30 Taq DNA Polymerase
- 3.2.31 Nuclease-Free Water
- 3.2.32 0.8% Agarose gel
- 3.2.33 สารละลายบัฟเฟอร์ 1X TAE
- 3.2.34 buffer PB
- 3.2.35 buffer PE
- 3.2.36 buffer EB

3.3 ขั้นตอนการดำเนินการ

3.3.1 แบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษา

แบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษา 3 ชนิด ได้แก่ ไอโซเลต AG2 DG1 และ DG2 ซึ่งไอโซเลต AG2 คัดแยกมาจากฝรั่งน้ำ ไอโซเลต DG1 และ DG2 คัดแยกมาจากองุ่นน้ำ (ประภัสสร เทพกัณฑ์ และ สุพรรณิกา ยอดสง่า, 2557) โดยแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลตได้มีการคัดแยกเอาไว้ก่อนหน้านี้แล้ว

3.3.2 การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของแบคทีเรีย

ทำการตรวจสอบลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษาจากการเจริญบนผิวหน้าอาหารแข็ง โดยดูจากสี รูปร่าง และขอบ จากนั้นทำการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยการย้อมแกรม เพื่อตรวจสอบรูปร่างของเซลล์ การจัดเรียงตัว จำแนกแกรมของแบคทีเรีย และวัดขนาดของเซลล์แบคทีเรีย

3.3.2.1 การย้อมแกรม

ทำการย้อมแกรมเพื่อศึกษารูปร่าง การจัดเรียงตัว จำแนกแกรมของแบคทีเรีย และวัดขนาดของเซลล์แบคทีเรีย โดยหยดแบคทีเรียลงบนสไลด์ 1 หยด เกลี่ยแบคทีเรียให้กระจายบางๆ บนสไลด์ (Smear) นำสไลด์ไปผ่านเปลวไฟ 2-3 ครั้ง เพื่อให้แบคทีเรียแห้งติดสไลด์ (Fix) แล้วหยดสีคริสตัลไวโอเล็ต (Crystal violet) ให้ท่วมรอยเกลี่ยทิ้งไว้ 1 นาที แล้วเททิ้ง จากนั้นหยดสารละลายลูกลอไอโอดีน (Lugol's iodine) ทิ้งไว้ 1 นาที แล้วเทสารละลายทิ้ง ล้างสีออกด้วยการหยดแอลกอฮอล์ร้อยละ 95 ทิ้งไว้ 15 วินาที แล้วล้างด้วย

น้ำสะอาด จากนั้นหยดสีซาฟรานิน (Safranin) บนรอยเกลี่ยประมาณ 15-30 วินาที ล้างน้ำ
 เอกสารนี้เป็นเอกสารที่จัดทำขึ้นเพื่อใช้ในการเรียนการสอนเท่านั้น ไม่สามารถนำออกจำหน่ายหรือใช้
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ซัปรอยเกลี่ยให้แห้ง แล้วส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ แบบที่เรียกรวมจะติดสีม่วงของ คริสตัลไอโอดีน ส่วนแบคทีเรียแกรมลบจะติดสีแดงของซาฟรานิน จากนั้นจึงรวบรวมข้อมูล ลักษณะของแบคทีเรียที่ได้ เพื่อนำมาระบุชนิดของแบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษา (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ, 2553)

3.3.2.2 การย้อมสปอร์

ทำการย้อมสปอร์เพื่อศึกษาการสร้างสปอร์ของแบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษา โดยหยด แบคทีเรียลงบนสไลด์ 1 หยด เกลี่ยแบคทีเรียให้กระจายบางๆ บนสไลด์ (Smear) นำสไลด์ ไปผานเปลวไฟ 2-3 ครั้ง เพื่อให้แบคทีเรียแห้งติดสไลด์ (Fix) แล้วหยดมาลาโคท กรีนในทิวม รอยเกลี่ยแบคทีเรีย แลวนำไปวางบนไอน้ำเดือดและตองคอยเติมมาลาโคท กรีน เพื่อไม่ให้สี แห้ง เมื่อครบ 5 นาที ให้เทสีทิ้งรอให้สไลด์เย็นกลางด้วยน้ำสะอาด หยดซาฟรานินแล้วทิ้งไว้ 1 นาที จากนั้นเทสีทิ้งแล้วล้างด้วยน้ำสะอาด ซัปรอยเกลี่ยให้แห้ง แล้วส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ ตัวเซลล์ปกติจะติดสีแดงของซาฟรานิน ส่วนสปอร์จะติดสีเขียวของมาลาโคท กรีน (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ, 2553)

3.3.3 การสกัด genomic DNA จากแบคทีเรีย

ทำการสกัด genomic DNA จากแบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษาได้แก่ ไอโซเลต AG2 DG1 และ DG2 โดยวิธีการดังต่อไปนี้

3.3.3.1 ทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในอาหาร Selective medium ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ในฟลาस्कขนาด 125 มิลลิลิตร และทำการเก็บเซลล์จากอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 7,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -80 หรือ -20 องศาเซลเซียส

3.3.3.2 ชั่งเซลล์ 0.15 กรัม และเติม TE/Lysozyme ปริมาตร 567 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสารละลาย นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง

3.3.3.3 เติม SDS ความเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร 30 ไมโครลิตร และ Protease K ปริมาตร 3 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง

3.3.3.4 เติม NaCl ความเข้มข้น 5 โมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสารละลาย

3.3.3.5 เติม CTAB ปริมาตร 80 ไมโครลิตร หรือสารละลาย NaCl และปั่นที่ อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที

3.3.3.6 เติม CI ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสารละลาย นาน 20-30 วินาที

3.3.3.7 ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่ 3.3.3.8 ย้ายสารละลายส่วนใสด้านบนใส่หลอดใหม่ ระวังไม่ให้ตะกอนเซลล์สีขาวตกค้าง ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลงไป

3.3.3.9 เติม PCI ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสารละลาย นาน 20-30 วินาที

3.3.3.10 ปั่นเหยียงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

3.3.3.11 ย้ายสารละลายส่วนใสด้านบนใส่หลอดใหม่ ระวังไม่ให้ตะกอนเซลล์สีขาว ตกลงไป

3.3.3.12 ทำซ้ำข้อ 3.3.3.10-3.3.3.11 ประมาณ 2 ครั้ง

3.3.3.13 เติม Isopropanol ปริมาตร 450 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเบาๆ ทั้งนี้ จะเห็น genomic DNA (เส้นสีขาว)

3.3.3.14 บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาทีและปั่นเหยียงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที

3.3.3.15 เท Isopropanol ทั้ง และเติม ethanol ร้อยละ 70 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นผสมให้เข้ากันเบาๆ เพื่อให้ 16s DNA ตกตะกอน

3.3.3.16 ปั่นเหยียงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที และใช้ปิเปตดูด ethanol ร้อยละ 70 ออก

3.3.3.17 ทำ 16s DNA ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

3.3.3.18 ละลาย 16s DNA ด้วย TE หรือ น้ำ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร

3.3.3.19 ตรวจสอบ 16s DNA โดย agarose gel electrophoresis โดยใช้ agarose gel ความเข้มข้น 0.8

3.3.3.20 เก็บรักษา 16s DNA ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.3.4 การเพิ่มปริมาณ 16s DNA โดยใช้เทคนิค PCR

3.3.4.1 เตรียมสารละลายที่ใช้ในเทคนิค PCR ดังตารางที่ 3.1 แต่สารที่ใช้ในแต่ละหลอดนั้นมีการใช้ในปริมาณน้อย จึงใช้การเตรียมแบบ Master Mix คือการเตรียมสารต่างๆพร้อมกัน แล้วแบ่งไปใช้ในแต่ละหลอดภายหลังแล้วปิเปต Master mix ตัวอย่างละ 49 ไมโครลิตร ผสมกับ 16s DNA หรือ Template DNA ตัวอย่างละ 1 ไมโครลิตร

ตารางที่ 3.1 แสดงส่วนประกอบปริมาตรที่ใช้ในปฏิกิริยา 50 ไมโครลิตร ในการทำ Master mix

| สารละลาย | ปริมาตรที่ใช้ใน ปฏิกิริยา 50 ไมโครลิตร |
|-------------------------------------|---|
| 10X Standard Taq Reaction Buffer | 5 ไมโครลิตร |
| 10 mM dNTPs | 1 ไมโครลิตร |
| 10 μ M Forward Primer (8F)* | 1 ไมโครลิตร |
| 10 μ M Reverse Primer (1492R)** | 1 ไมโครลิตร |
| Taq DNA Polymerase | 0.25 ไมโครลิตร |
| Nuclease-Free Water | 40.75 ไมโครลิตร |

หมายเหตุ *Forward Primer ที่ใช้คือ 8F (5'AGTTGATCCTGGCTCAG3')
**Reverse Primer ที่ใช้คือ 1492R (5'ACCTTGTTACGACTT3')

3.3.4.2 นำหลอด eppendorf ที่มีส่วนผสมระหว่าง 16s DNA และ Master mix เข้าเครื่อง DNA thermal cycle เพื่อเพิ่มปริมาณ DNA ดังตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 แสดงสภาวะขั้นตอนต่างๆ ในการใช้ตัวอย่างเข้าเครื่อง DNA thermal cycle

| ขั้นตอน | อุณหภูมิ | เวลา | จำนวนรอบ |
|----------------------|-----------------|------------------|----------|
| Initial denaturation | 95 องศาเซลเซียส | 30 วินาที | 1 รอบ |
| Denaturation | 95 องศาเซลเซียส | 30 วินาที | 30 รอบ |
| Annealing | 50 องศาเซลเซียส | 30 วินาที | |
| Extension | 68 องศาเซลเซียส | 1 นาที 30 วินาที | |
| Final extension | 68 องศาเซลเซียส | 5 นาที | 1 รอบ |
| Hold | 12 องศาเซลเซียส | | |

เทคนิค PCR อาศัยหลักการของการเกิด DNA replication ที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาแบบซ้ำๆกันหลายรอบในหลอดทดลอง โดยในปฏิกิริยาแต่ละรอบประกอบด้วย 3 ขั้นตอนดังนี้ (สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม และ อนุรักษ โพธิ์เอี่ยม, 2557)

โดย 1 รอบ จะประกอบด้วย 3 ขั้นตอนคือ

- denaturation คือการแยกดีเอ็นเอเกลียวคู่ออกจากกัน เป็นขั้นตอนที่ทำให้ดีเอ็นเอเสียสภาพด้วยความร้อนแยกออกจากกันเป็นสายเดี่ยวเป็นการทำลายพันธะไฮโดรเจนที่ความร้อนประมาณ 90-95 องศาเซลเซียส (สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม และ อนุรักษ โพธิ์เอี่ยม, 2557)
- annealing คือการจับของไพรเมอร์กับดีเอ็นเอแม่แบบ เป็นขั้นตอนที่ไพรเมอร์ทั้ง 2 ชนิดเข้าจับกับเบสคู่สมบนดีเอ็นเอสายเดี่ยว โดยจะเกิดในช่วงอุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียส (สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม และ อนุรักษ โพธิ์เอี่ยม, 2557)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- extension คือการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ต่อจากไพรเมอร์ เป็นขั้นตอนที่เริ่มเกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ โดยเชื่อมนิวคลีโอไทด์ที่ปลาย 3'-OH ของไพรเมอร์ อุณหภูมิที่เหมาะสมประมาณ 68-72 องศาเซลเซียส (สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม และ อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม, 2557)

โดยทั่วไปแล้วนิยมทำซ้ำทั้งสามขั้นตอนประมาณ 25-30 รอบ โดยปริมาณดีเอ็นเอ จะมีการเพิ่มขึ้นแบบเรขาคณิต คือ หากมีการทำซ้ำถึง 30 รอบ จะได้ปริมาณดีเอ็นเอถึง 1073741824 โมเลกุลและเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพมากขึ้นของการเกิดปฏิกิริยา จะมีการทำ ขั้นตอน Initial Denaturation คือการทำให้ดีเอ็นเอเสียสภาพก่อนเริ่มทำปฏิกิริยา และเพิ่ม ขั้นตอนการ Final Extension คือ การเพิ่มการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ก่อนสิ้นสุด ปฏิกิริยา (สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม และ อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม, 2557)

3.3.4.3 ตรวจสอบผลการเพิ่มปริมาณ DNA หลังจากที่ใช้เทคนิค PCR โดยทำการตรวจสอบ ด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis (0.8% Agarose gel) ปริมาตร 3 ไมโครลิตร ในสารละลาย บัฟเฟอร์ 1X TAE ที่ความต่างศักย์ 180 โวลต์ 200 มิลลิแอมป์ เป็นเวลา 15 นาที โดยเปรียบเทียบกับ ดีเอ็นเอเครื่องหมายขนาด 1,000 คู่เบส ยี่ห้อ New England Biolabs®

3.3.5 การทำ 16s DNA ให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุด QIAquick® PCR Purification Kit

3.3.5.1 เติม Buffer PB (5 M Gu-HCl ; 30% isopropanol) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และ เติม DNA ที่ผ่านการเพิ่มปริมาณโดยใช้เทคนิค PCR ปริมาตร 50 ไมโครลิตร จากนั้นผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 30 วินาที

3.3.5.2 ทำการย้ายเฉพาะคอลัมน์ลงในหลอดใหม่ จากนั้นเติม Buffer PE (10 mM Tris-HCl pH 7.5; 80% ethanol) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบ/ นาที เป็นเวลา 30 วินาที

3.3.5.3 เท buffer ทั้ง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที

3.3.5.4 ทำการย้ายเฉพาะคอลัมน์ลงในหลอดใหม่ จากนั้นเติม Buffer EB (10 mM Tris-HCl pH 8.5) ปริมาตร 53 ไมโครลิตร โดยทำการหยด buffer ให้ลงไปตรงกลางของ membrane ที่มี ลักษณะเป็นวงกลมสีขาว ทิ้งไว้ 1 นาที เพื่อให้ buffer ซึมผ่าน membrane และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ ความเร็วรอบ 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที

3.3.5.5 ทำการเก็บ DNA ที่บริสุทธิ์ปริมาตร 53 ไมโครลิตร ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปหาลำดับเบสของดีเอ็นเอต่อไป

3.3.6 การศึกษาสถานะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดมาลิก

3.3.6.1 การเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้น

หลังจากที่ทำการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา และ 16s rRNA พบว่าไอโซเลต AG2 และ DG2 เป็นแบคทีเรียที่น่าสนใจ จึงเลือก 2 ไอโซเลตนี้มาทำการศึกษาในครั้งนี้ โดยการเตรียม แบคทีเรียเริ่มต้นจะเริ่มจากการเพาะเลี้ยงไอโซเลต AG2 และ DG2 ในสูตรอาหารแข็ง Selective medium (ภาคผนวก ก ข้อ 1.1) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ไม่เกิน 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อ เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากอาหารแข็งลงในอาหารเหลว Selective medium ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ในพลาสติกขนาด 125 มิลลิลิตร นำไปเลี้ยงในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ไม่เกิน 18 ชั่วโมง จากนั้นนำหัวเชื้อที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เพื่อปรับให้หัวเชื้อเริ่มต้นมีค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ประมาณ 1.0

3.3.6.2 การศึกษาผลของชนิดของอาหารต่อการผลิตกรดมาลิก

ชนิดของอาหารที่ใช้ในการศึกษาคือ อาหารเหลว Selective medium (ภาคผนวก ก ข้อ 1.1) และอาหารเหลว Shaker culture medium (ภาคผนวก ก ข้อ 2.1) โดยเตรียมอาหารทั้ง 2 ชนิด ปริมาตรอาหาร 30 มิลลิลิตร ในพลาสติกขนาด 125 มิลลิลิตร ซึ่งอาหารทั้ง 2 ชนิด ใช้กลูโคส เริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตรและแคลเซียมคาร์บอเนต 30 กรัมต่อลิตร จากนั้นนำหัวเชื้อที่เตรียมได้จาก ข้อ 3.3.6.1 ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ใส่ลงไปในอาหารทั้ง 2 ชนิด นำไปเลี้ยงในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยจะเก็บตัวอย่างเมื่อน้ำเลี้ยงใส (แคลเซียมในอาหารหมด) เพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณกรดมาลิกด้วย HPLC

3.3.6.3 การศึกษาผลของกลูโคสเริ่มต้นต่อการผลิตกรดมาลิก

ชนิดของอาหารที่ใช้ในการศึกษาคือ อาหารเหลว Shaker culture medium โดยเตรียมอาหารลงในพลาสติกขนาด 125 มิลลิลิตร ปริมาตรอาหาร 30 มิลลิลิตร ใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน โดยกลูโคสที่ใช้มีความเข้มข้น 100 150 200 และ 250 กรัมต่อลิตร ทำการแยกเซลล์ โดยการเคลฟน้ำตาลรวมกับแคลเซียมคาร์บอเนตแยกออกจากสารอาหารชนิดอื่นๆ เพื่อป้องกันการเกิดปฏิกิริยาเมลลาร์ด ที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์แบคทีเรียที่เพาะเลี้ยง (พรพิมล ม่วงไทย, 2553) และใช้หัวเชื้อเริ่มต้นที่เตรียมได้จากข้อ 3.3.6.1 ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเลี้ยงแบบสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทำการเก็บตัวอย่างตั้งแต่วันที่ 0 และทุกๆ 24 ชั่วโมง จนครบ 3 วัน เพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณกรดมาลิก กลูโคสที่เหลือ และค่าพีเอชที่ลดลง ทำ 2 ซ้ำในทุกการทดลอง

3.3.6.4 การศึกษาผลของปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตต่อการผลิตกรดมาลิก

ชนิดอาหารที่ใช้ในการศึกษาคือ อาหารเหลว Shaker culture medium โดยเตรียมอาหารในพลาสติกขนาด 125 มิลลิลิตร ปริมาตรอาหาร 30 มิลลิลิตร ปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตที่ใช้คือ 10 30 และ 50 กรัมต่อลิตร ใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน โดยความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นในแต่ละไอโซเลตได้จากการทดลองในข้อ 3.3.6.3 ทำการแยกเซลล์ โดยการเคลฟน้ำตาลรวมกับแคลเซียมคาร์บอเนตแยกออกจากสารอาหารชนิดอื่นๆ เพื่อป้องกันการเกิดปฏิกิริยาเมลลาร์ด ที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์แบคทีเรียที่เพาะเลี้ยง (พรพิมล ม่วงไทย, 2553) และใช้หัวเชื้อที่เตรียมได้จากข้อ 3.3.6.1 ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเลี้ยงแบบสภาวะเขย่า ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เซลเซียส ทำการเก็บตัวอย่างตั้งแต่วันที่ 0 และทุกๆ 24 ชั่วโมง จนครบ 3 วัน เพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณกรดมาลิก กลูโคสที่เหลือ และค่าพีเอชที่ลดลง ทำ 2 ซ้ำในทุกการทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3 วัน (ไอโซเลต AG2) และ 6 วัน (ไอโซเลต DG2) เพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณกรดมาลิก กลูโคสที่เหลือ และค่าพีเอชที่ลดลง

3.3.6.5 การวิเคราะห์ปริมาณกรดมาลิกและสารเมตาบอไลต์ต่างๆ

เมื่อทำการเลี้ยงจนครบเวลาที่กำหนด นำน้ำเลี้ยงที่ได้จากการเพาะเลี้ยง ไปทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 9,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกเอาตะกอนเซลล์ออก แล้วนำของเหลวส่วนใสที่ได้มากรองอีกครั้งด้วยชุดกรองที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของรูพรุน 0.22 ไมครอน ให้ได้ปริมาตรของสารละลายที่กรองได้ 1.5 มิลลิลิตร แล้วนำไปเก็บไว้ในขวดไวแอลที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณกรดมาลิกและสารเมตาบอไลต์ต่างๆ ด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ต่อไป (ประภัสสร เทพกัญท์ และ สุพรรณนิภา ยอดสง่า 2557) โดยมีรายละเอียดของเครื่อง HPLC และสภาวะที่ใช้ดังนี้

| | | |
|--------------|---|--|
| HPLC | : | Shimadzu model LC-20A |
| คอลัมน์ | : | Aminex HPX - 87H (ความยาวของคอลัมน์ 300x7.8 มิลลิเมตร) |
| ตัวทำละลาย | : | กรดซัลฟูริก (H ₂ SO ₄) 0.005 โมลาร์ |
| อัตราการไหล | : | 0.6 มิลลิลิตรต่อนาที |
| อุณหภูมิ | : | 30 องศาเซลเซียส |
| ตัวจับสัญญาณ | : | UV ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

จากงานวิจัยของประภัสสร เทพกัมภ์ และสุพรรณิภา ยอดสง่า (2557) ได้ทำการคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดจากแหล่งธรรมชาติ โดยสามารถคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดมาลิกได้สูง ได้แก่ ไอโซเลต AG2 DG1 และ DG2 โดยสามารถผลิตกรดมาลิกได้ 68.660 49.241 และ 68.964 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ทางคณะผู้วิจัยจึงสนใจนำแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลตนี้มาทำการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมเพื่อให้แบคทีเรียสามารถผลิตกรดมาลิกได้เพิ่มขึ้น โดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนเริ่มต้น

4.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาทั่วไปของแบคทีเรีย

ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาทั่วไปของแบคทีเรีย 3 ไอโซเลต คือ AG2 DG1 และ DG2 โดยนำมาตรวจสอบลักษณะของโคโลนี ได้แก่ รูปร่าง ความหนูน สี ขอบ และความมันวาว นอกจากนี้ยังได้ตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของจุลินทรีย์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1000 เท่า โดยการย้อมแกรม เพื่อดูการติดสีแกรม ลักษณะรูปร่าง การจัดเรียงตัว และขนาดของเซลล์ ซึ่งลักษณะทางสัณฐานวิทยาทั่วไปของแต่ละไอโซเลตมีลักษณะดังนี้

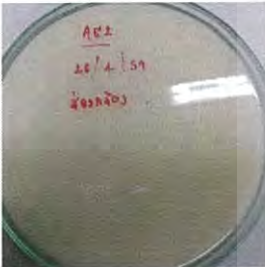



ไอโซเลต AG2 จะมีลักษณะโคโลนีที่กลม แบน สีครีมขุ่น และขอบเรียบ มีรูปร่างเป็นท่อนสั้นอยู่เป็นเซลล์เดี่ยว ไม่มีการสร้างสปอร์ เป็นแกรมลบ และมีขนาดเซลล์ 1.294 ไมครอน

ไอโซเลต DG1 จะมีลักษณะโคโลนีที่กลม แบน สีครีม และขอบเรียบ มีรูปร่างเป็นท่อนสั้นอยู่เป็นเซลล์เดี่ยว ไม่มีการสร้างสปอร์ เป็นแกรมลบ และมีขนาดเซลล์ 1.285 ไมครอน



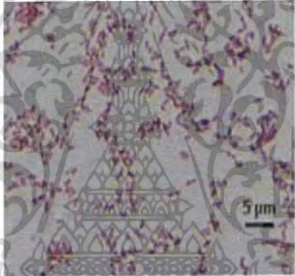
ไอโซเลต DG2 จะมีลักษณะโคโลนีที่กลม แบน สีครีม และขอบเรียบ มีรูปร่างเป็นท่อนสั้นอยู่เป็นเซลล์เดี่ยว ไม่มีการสร้างสปอร์ เป็นแกรมลบ และมีขนาดเซลล์ 1.288 ไมครอน

โดยลักษณะทางสัณฐานวิทยาทั่วไปของไอโซเลต AG2 DG1 และ DG2 แสดงดังตารางที่ 4.1

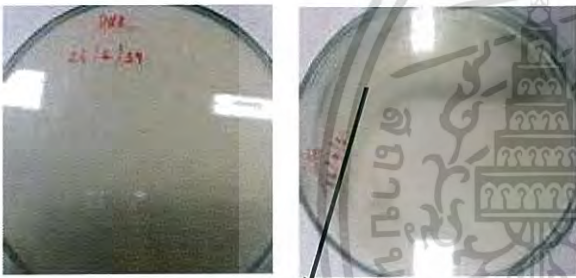

ตารางที่ 4.1 ตารางแสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาทั่วไปของไอโซเลต AG2 DG1 และ DG2

| ไอโซเลต | ลักษณะการเกิดเคลือบชีวบนอาหารแข็ง | ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ | ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของจุลินทรีย์ | | | | |
|---------|--|--|------------------------------------|-------------------------------------|-------------------|-----------------|-----------------------|
| | | | ลักษณะ โคโลนี | รูปร่าง | การสร้าง สปอร์ | การย้อม แกรม | ขนาดเซลล์ (ไมครอน) |
| AG2 |    <div data-bbox="513 837 927 914" style="border: 1px solid orange; padding: 5px; margin-top: 10px;"> ลักษณะของเส้นผ่านศูนย์กลางวงใส </div> |  | กลม แบน สี ครีมขุ่น ขอบเรียบ | ท่อนสั้น อยู่เป็น เซลล์เดี่ยว | ไม่มี | แกรมลบ | 1.294 |

ตารางที่ 4.1(ต่อ) ลักษณะทางสัณฐานวิทยาทั่วไปของไอโซเลต AG2 DG1 และ DG2

| ไอโซเลต | ลักษณะการเกิดเคสึร์โชนบนอาหารแข็ง | ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ | ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของจุลินทรีย์ | | | | |
|---------|--|--|-----------------------------------|-------------------------------------|-------------------|-----------------|-----------------------|
| | | | ลักษณะ โคโลนี | รูปร่าง | การสร้าง สปอร์ | การย้อม แกรม | ขนาดเซลล์ (ไมครอน) |
| DG1 |   <div style="border: 1px solid orange; padding: 5px; display: inline-block; margin-top: 10px;">ลักษณะของเส้นผ่านศูนย์กลางวงใส</div> |  | กลม แบน สี ครีม ขอบ เรียบ | ท่อนสั้น อยู่เป็น เซลล์เดี่ยว | ไม่มี | แกรมลบ | 1.285 |

ตารางที่ 4.1(ต่อ) ลักษณะทางสัณฐานวิทยาทั่วไปของไอโซเลต AG2 DG1 และ DG2

| ไอโซเลต | ลักษณะการเกิดเคลือบรโชนบนอาหารแข็ง | ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ | ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของจุลินทรีย์ | | | | |
|---------|---|--|-----------------------------------|-------------------------------------|-------------------|-----------------|-----------------------|
| | | | ลักษณะ โคโลนี | รูปร่าง | การสร้าง สปอร์ | การย้อม แกรม | ขนาดเซลล์ (ไมครอน) |
| DG2 |  <p>ลักษณะของเส้นผ่านศูนย์กลางวงโต</p> |  | กลุม แบน สี ครีม ขอบ เรียบ | ท่อนสั้น อยู่เป็น เซลล์เดี่ยว | ไม่มี | แกรมลบ | 1.288 |

4.2 การศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของแบคทีเรียโดยการตรวจสอบยีน 16s rRNA

ทำการเพาะเลี้ยงไอโซเลต AG2 DG1 และ DG2 ในอาหารเหลวสูตร selective medium ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ที่มีกลูโคส 100 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน (Tabuchi และคณะ, 1981) โดยไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตลงไป แล้วทำการเพาะเลี้ยงที่สภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง แล้วทำการเก็บเกี่ยวเซลล์โดยนำน้ำเลี้ยงไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 7000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเทส่วนใสออกให้เหลือแต่ตะกอนเซลล์แล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 หรือ -80 องศาเซลเซียสข้ามคืน เพื่อนำไปจีโนมิกส์สกัดดีเอ็นเอเพื่อการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของแบคทีเรียโดยการตรวจสอบยีน 16s rRNA ต่อไป

จากการศึกษาของ Yarza และคณะ (2014) และ Janda และคณะ (2007) พบว่าเมื่อเปรียบเทียบค่าความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่งยีน 16s rRNA ของสิ่งมีชีวิตหนึ่งคล้ายกับสิ่งมีชีวิตหนึ่งที่ร้อยละ 75.0 แสดงว่าสิ่งมีชีวิตทั้งสองจัดอยู่ในไฟลัม (Phylum) เดียวกัน ค่าความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่งยีน 16s rRNA ของสิ่งมีชีวิตหนึ่งคล้ายกับสิ่งมีชีวิตหนึ่งที่ร้อยละ 78.5 แสดงว่าสิ่งมีชีวิตทั้งสองจัดอยู่ในคลาส (Class) เดียวกัน ค่าความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่งยีน 16s rRNA ของสิ่งมีชีวิตหนึ่งคล้ายกับสิ่งมีชีวิตหนึ่งที่ร้อยละ 82.0 แสดงว่าสิ่งมีชีวิตทั้งสองจัดอยู่ในออเดอร์ (Order) เดียวกัน ค่าความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่งยีน 16s rRNA ของสิ่งมีชีวิตหนึ่งคล้ายกับสิ่งมีชีวิตหนึ่งที่ร้อยละ 86.5 แสดงว่าสิ่งมีชีวิตทั้งสองจัดอยู่ในวงศ์ (Family) เดียวกัน ค่าความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่งยีน 16s rRNA ของสิ่งมีชีวิตหนึ่งคล้ายกับสิ่งมีชีวิตหนึ่งที่ร้อยละ 94.5 แสดงว่าสิ่งมีชีวิตทั้งสองจัดอยู่ในจีนัส (Genus) เดียวกัน และค่าความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่งยีน 16s rRNA ของสิ่งมีชีวิตหนึ่งคล้ายกับสิ่งมีชีวิตหนึ่งที่ร้อยละ 97.0 แสดงว่าสิ่งมีชีวิตทั้งสองจัดอยู่ในสปีชีส์ (Species) เดียวกัน

จากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บน 16s rRNA ด้วยโปรแกรม Blast บนฐานข้อมูล The National Center for Biotechnology Information (NCBI) พบว่า ไอโซเลต AG2 มีความคล้ายคลึงกับ *Leucobacter komagatae* ร้อยละ 79 เมื่อทำการศึกษาพบว่า *L. komagatae* จัดอยู่ในจำพวกแอคติโนแบคทีเรีย ต้องการอากาศในการเจริญเติบโต เป็นแกรมบวก ย้อมติดสีม่วงของคริสตัลไวโอเลต และมีลักษณะโคโลนีเป็นเส้นใยคล้ายราแต่ไม่มีสปอร์ฟุ้ง และแพ็คตัวกันแน่นในลักษณะที่กลมบนอาหารแข็ง (Takeuchi และคณะ, 1996) ซึ่งจากลักษณะที่กล่าวมาข้างต้นนั้นไม่ตรงกับลักษณะโคโลนีที่ทำการเพาะเลี้ยงอยู่ นั่นคือมีลักษณะที่กลมและแบน ขอบเรียบ สีครีมขุ่น เมื่อนำไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1000 เท่า พบว่าเซลล์มีลักษณะเป็นท่อนสั้น ติดสีแดงของซาฟานินแสดงว่าเป็นแบคทีเรียแกรมลบและไม่มีการสร้างสปอร์ ซึ่งผลการทดลองของการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของจุลินทรีย์โดยการตรวจสอบยีน 16s rRNA นั้นไม่ตรงกับการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาทั่วไปของจุลินทรีย์ คาดว่าน่าจะเกิดความผิดพลาดในขั้นตอนการสกัด genomic DNA ทำให้ได้ปริมาณ 16s DNA ที่น้อยมาก เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์บน 16s rRNA ด้วยโปรแกรม Blast บนฐานข้อมูล NCBI อาจจะส่งผลให้เกิดความคาดเคลื่อนได้ และอีก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนำไปเผยแพร่ขึ้นทึ่สาธารณะโดยไม่ได้รับอนุญาต
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข้อสังเกตหนึ่งคือค่า E ที่หากมีความแม่นยำมากจะมีค่าอยู่ที่ 0.0 ในที่นี้มีค่า E เท่ากับ 0.12 ซึ่งถือว่ามีค่าสูงมากแสดงถึงความแม่นยำที่ต่ำ

ไอโซเลต DG1 และ DG2 นั้นพบที่มีความคล้ายคลึงกับ *Acetobacter qhanensis* ร้อยละ 98 เหมือนกัน และงานวิจัยของ Spitaels และคณะ (2014) พบว่า *A. qhanensis* มีลักษณะโคโลนีที่กลมและแบน ขอบเรียบ สีครีม ต้องการอากาศในการเจริญเติบโต มีลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1000 เท่า คือ เซลล์มีลักษณะเป็นท่อน เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ติดสีแดงของซาฟานิน สามารถเคลื่อนที่ได้ และไม่มีการสร้างสปอร์ ซึ่งคล้ายกับการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของการศึกษานี้ นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียชนิดนี้เป็นแบคทีเรียที่มีความสามารถในการออกซิไดส์เอทิลแอลกอฮอล์ให้เป็นกรดแอสติก (acetic acid) ในภาวะที่มีออกซิเจน จึงจัดอยู่ในกลุ่ม acetic acid bacteria

เนื่องจากไอโซเลต DG1 และ DG2 เป็นแบคทีเรียชนิดเดียวกัน ดังนั้นจึงคัดเลือกไอโซเลต DG2 เพราะมีความสามารถในการผลิตกรดมาลิกได้ 68.964 กรัมต่อลิตร ซึ่งสูงกว่าไอโซเลต DG1 ที่มีความสามารถในการผลิตกรดมาลิกได้ 49.241 กรัมต่อลิตร (ประภัสสร เทพกัณฑ์ และสุพรรณนิภา ยอดสง่า, 2557) ไปทำการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่างๆ ร่วมกับไอโซเลต AG2 ต่อไป

จากรายงานก่อนหน้านี พบจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตกรดมาลิกได้ ซึ่งแสดงดังตารางที่ 4.2 ซึ่งปริมาณของกรดมาลิกที่ผลิตได้ขึ้นกับชนิดของจุลินทรีย์และความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่ใช้ แต่จากการศึกษาที่ผ่านมายังไม่พบว่า *Leucobacter komagatae* และ *Acetobacter qhanensis* ถูกรายงานว่าสามารถผลิตกรดมาลิกได้ ดังนั้นไอโซเลต AG2 และ DG2 จึงน่าสนใจที่จะศึกษาต่อไป

ตารางที่ 4.2 ชนิดของจุลินทรีย์และชนิดของแหล่งคาร์บอนที่สามารถผลิตกรดมาลิกได้

| จุลินทรีย์ | สายพันธุ์ | แหล่งคาร์บอน | ความเข้มข้นเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร) | กรดมาลิก (กรัมต่อลิตร) | เอกสารอ้างอิง |
|--|-----------|--------------|--------------------------------------|---------------------------|-----------------------------|
| <i>Aspergillus flavus</i> | ดั้งเดิม | กลูโคส | 100.00 | 58.40 | Peleg และคณะ, 1988 |
| <i>Aspergillus flavus</i> | ดั้งเดิม | กลูโคส | 100.00 | 39.00 | Battat และคณะ, 1990 |
| <i>Aspergillus flavus</i> ATCC 13697 | ดั้งเดิม | กลูโคส | 120.00 | 113.00 | Battat และคณะ, 1990 |
| <i>Schizophyllum commune</i> | ดั้งเดิม | กลูโคส | 50.00 | 18.00 | Kawagoe และคณะ, 1997 |
| <i>Zygosaccharomyces rouxii</i> | ดั้งเดิม | กลูโคส | 300.00 | 75.00 | Taing O. และ Taing K., 2007 |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | ดั้งเดิม | กลูโคส | 100.00 | 0.19 | Zelle และคณะ, 2008 |
| <i>Escherichia coli</i> | ดั้งเดิม | กลูโคส | 100.00 | 0.47 | Zhang และคณะ, 2011 |
| <i>Aspergillus oryzae</i> NRRL 3488 | ดั้งเดิม | กลูโคส | 100.00 | 38.86 | Brown และคณะ, 2013 |
| <i>Aspergillus oryzae</i> NRRL 3488 | ดั้งเดิม | กลูโคส | 50.00 | 34.00 | Knuf และคณะ, 2013 |
| <i>Nocardia</i> sp. CCM 4837/A | ดั้งเดิม | กลูโคส | 120.00 | 62.90 | Hronska และคณะ, 2014 |
| <i>Aureobasidium pullulan</i> | ดั้งเดิม | ไซโลส | 90.00 | 38.60 | Zou และคณะ, 2014 |
| <i>Aureobasidium pullulan</i> CCTCCM 2012223 | ดั้งเดิม | กลูโคส | 110.00 | 15.27 | Zou และคณะ, 2015 |
| <i>Ustilago trichophora</i> TZ1 | ดั้งเดิม | กลีเซอรอล | 150.00 | 196.00 | Zambanini และคณะ, 2016 |
| <i>Leucobacter komagotae</i> | ดั้งเดิม | กลูโคส | 200.00 | 71.36 | การศึกษานี้ |
| <i>Acetobacter ghanens</i> | ดั้งเดิม | กลูโคส | 150.00 | 39.71 | การศึกษานี้ |

4.3 ผลของชนิดของอาหารต่อการผลิตกรดมาลิก

ทำการเพาะเลี้ยงไอโซเลต AG2 และ DG2 ในอาหารเหลวสูตร selective และ shaker culture ที่มีกลูโคส 100 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน (Tabuchi และคณะ, 1981) โดยเติมแคลเซียมคาร์บอเนต 30 กรัมต่อลิตร ทำการเพาะเลี้ยงที่สภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ปริมาณอาหาร 30 มิลลิลิตร ทำการเก็บตัวอย่างเมื่อจุลินทรีย์ใช้แคลเซียมคาร์บอเนตหมด (ประภัสสร เทพกัณฑ์ และสุพรรณนิภา ยอดสง่า, 2557) จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างน้ำเลี้ยงไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 9000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาทีเพื่อแยกเอาตะกอนเซลล์ออก และนำส่วนใสที่ได้ไปกรองด้วยเมมเบรนที่มีรูพรุนขนาด 0.02 ไมครอน จากนั้นส่วนใสที่กรองได้ไปทำการวิเคราะห์หาปริมาณกรดมาลิกและสารเมตาบอไลต์ต่างๆ ด้วยเครื่อง HPLC ปริมาณกรดมาลิกที่ผลิตได้แสดงดังตารางที่ 4.3

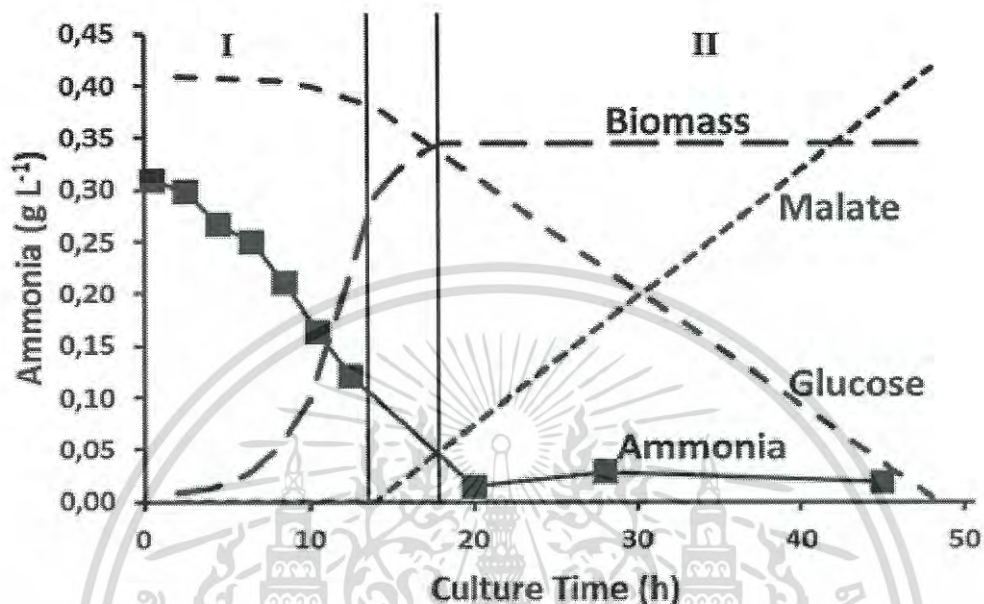
ตารางที่ 4.3 ปริมาณกรดมาลิกที่จุลินทรีย์ผลิตได้เมื่อใช้สูตรอาหาร selective medium และ shaker culture medium

| ไอโซเลต | กรดมาลิก (กรัมต่อลิตร) | |
|---------|------------------------|-----------------------|
| | สูตรอาหาร | |
| | selective medium | shaker culture medium |
| AG2 | 57.54 ± 5.07 | 62.93 ± 2.74 |
| DG2 | 48.77 ± 8.36 | 72.38 ± 1.75 |

จากตารางที่ 4.3 พบว่า เมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร ที่ไอโซเลต AG2 เมื่อใช้อาหาร selective medium และ shaker culture medium ได้ปริมาณกรดมาลิกเท่ากับ 57.54 ± 5.07 และ 62.93 ± 2.74 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่วนไอโซเลต DG2 ได้ปริมาณกรดมาลิก 48.77 ± 8.36 และ 72.38 ± 1.75 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เนื่องจากทั้ง 2 ไอโซเลตได้ปริมาณกรดมาลิกสูงกว่าเมื่อใช้อาหาร shaker culture medium ดังนั้นจึงทำการคัดเลือกสูตรอาหารนี้ไปทดสอบผลของปริมาณกลูโคสเริ่มต้น และแคลเซียมคาร์บอเนตต่อการผลิตกรดมาลิกต่อไป

จากผลที่ได้พบว่าทั้งสองไอโซเลตสามารถผลิตกรดมาลิกได้สูงกว่าเมื่อใช้อาหาร shaker culture medium เนื่องจากมีปริมาณแหล่งไนโตรเจนน้อยกว่าอาหาร selective medium ได้แก่ yeast extract 1.0 กรัมต่อลิตร (selective medium 5.0 กรัมต่อลิตร) และเติมแอมโมเนียมคลอไรด์ 3.0 กรัมต่อลิตร ดังนั้นเมื่อรวมปริมาณแหล่งไนโตรเจนในอาหารทั้ง 2 ชนิด พบว่า selective medium มีปริมาณไนโตรเจน 5.0 กรัมต่อลิตร ในขณะที่สูตร shaker culture medium มีปริมาณไนโตรเจน 1.0 กรัมต่อลิตร เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาตจากเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

น้อยกว่าที่ 4.0 กรัมต่อลิตร ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Knuf (2014) ได้ทำการศึกษาผลแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตกรดมาลิก พบว่าเมื่อปริมาณไนโตรเจนลดลง ส่งผลให้ *Aspergillus flavus* ผลิตกรดมาลิกได้สูงขึ้นดังรูป 4.1



รูปที่ 4.1 แสดงให้เห็นถึงปริมาณมวลเซลล์ แหล่งไนโตรเจน (แอมโมเนีย) กลูโคสที่ลดลง และมาเลตที่เพิ่มขึ้นที่ระยะเวลาต่างๆ
ที่มา : Knuf (2014)

จากรูปที่ 4.1 จะเห็นได้ว่าเมื่อใช้แอมโมเนียเริ่มต้น 0.30 กรัมต่อลิตร ใน 20 ชั่วโมงแรก ปริมาณกรดมาลิกที่ผลิตได้ยังอยู่ที่ 0 กรัมต่อลิตร แต่เมื่อปริมาณแอมโมเนียลดลงอยู่ที่ ประมาณ 0.2 ถึง 0.5 กรัมต่อลิตร กรดมาลิกเพิ่มสูงขึ้นด้วยความชันคงที่

4.4 ผลของปริมาณกลูโคสเริ่มต้นต่อการผลิตกรดมาลิก

ทำการเพาะเลี้ยงไอโซเลต AG2 และ DG2 ในอาหารเหลว shaker culture (Tabuchi และคณะ, 1981) ใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนเริ่มต้นที่ความเข้มข้น 100 150 200 250 กรัมต่อลิตร และเติมแคลเซียมคาร์บอเนต 30 กรัมต่อลิตร (ทำการทดลอง 2 ซ้ำ) โดยใช้สภาวะการเพาะเลี้ยงและเก็บตัวอย่างดังหัวข้อ 4.3 โดยเก็บตัวอย่างตั้งแต่วันที่ 0 และเก็บตัวอย่างทุกๆ 24 ชั่วโมงจนครบ 3 วัน จากนั้นนำไปตรวจวัดพีเอช วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลที่เหลืออยู่ด้วยวิธีดีเอ็นเอส (DNS method) และปริมาณกรดมาลิก ผลการทดลองที่ได้แสดงดังตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 ผลของกลูโคสเริ่มต้นที่ความเข้มข้น 100 150 200 และ 250 กรัมต่อลิตร ต่อปริมาณกรดมาลิก ร้อยละผลได้ และอัตราการผลิตของไอโซเลต AG2 และ DG2

| ไอโซเลต | ความเข้มข้นกลูโคส (กรัมต่อลิตร) | กรดมาลิก (กรัมต่อลิตร) | ร้อยละผลได้ | อัตราการผลิต (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง) |
|---------|------------------------------------|---------------------------|--------------|---|
| AG2 | 100 | 67.92 ± 4.78 | 50.13 ± 3.52 | 0.94 |
| | 150 | 44.20 ± 0.62 | 21.32 ± 0.30 | 0.61 |
| | 200 | 71.36 ± 0.54 | 25.29 ± 0.19 | 0.99 |
| | 250 | 68.07 ± 1.80 | 26.94 ± 0.71 | 0.95 |
| DG2 | 100 | 24.40 ± 1.44 | 16.84 ± 0.99 | 0.34 |
| | 150 | 39.71 ± 0.97 | 21.48 ± 0.52 | 0.55 |
| | 200 | 36.85 ± 0.84 | 18.26 ± 0.41 | 0.51 |
| | 250 | 37.78 ± 1.45 | 14.20 ± 0.55 | 0.52 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากตารางที่ 4.4 ซึ่งได้ทำการทดลองโดยใช้กลูโคสที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 100 150 200 และ 250 กรัมต่อลิตร สำหรับไอโซเลต AG2 ที่ความเข้มข้นกลูโคส 100 กรัมต่อลิตรพบว่าสุดท้ายได้ปริมาณกรดมาลิกเท่ากับ 67.92 ± 4.78 กรัมต่อลิตร ไม่พบกรดซัคซินิกและกรด 3-ไฮดรอกซีไพรูวิกอินิก ในขณะที่พบกรดอะดิพิคในปริมาณแค่ 0.52 กรัมต่อลิตร ขณะที่พีเอช และปริมาณกลูโคสที่เหลือเป็นดังรูปที่ 4.2A และร้อยละผลได้เท่ากับ 50.13 ± 3.52

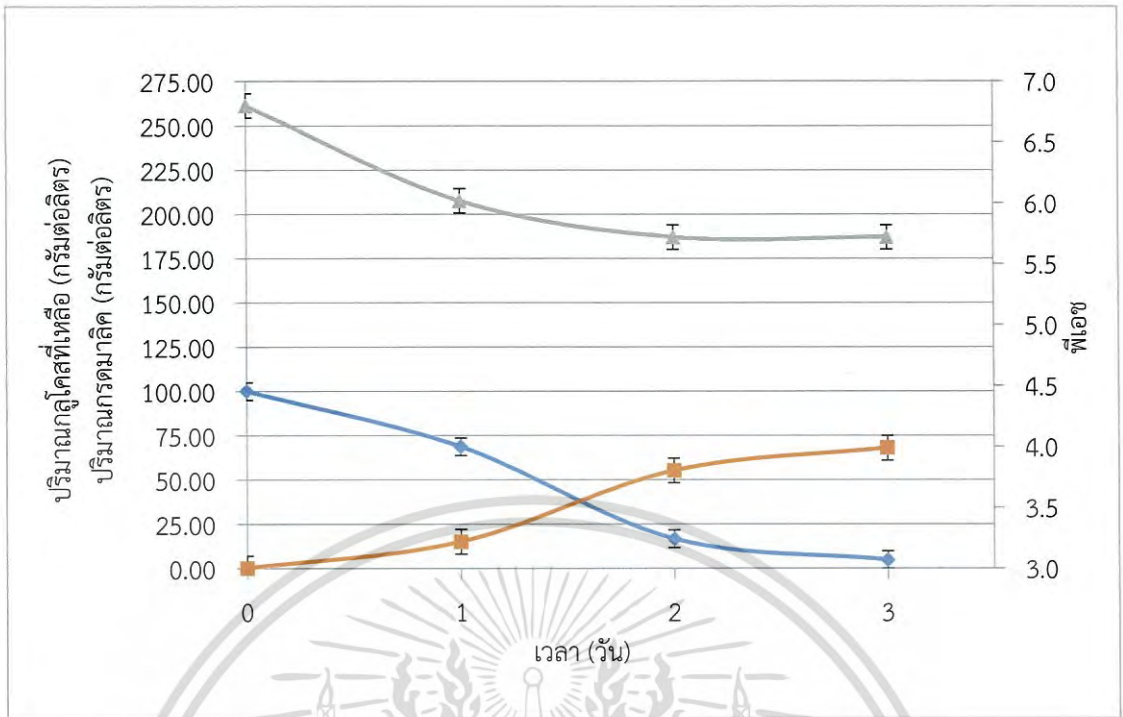
ที่ความเข้มข้นกลูโคส 150 กรัมต่อลิตร พบว่าปริมาณกรดมาลิกในวันที่ 3 เท่ากับ 44.20 ± 0.62 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีค่าน้อยกว่าการใช้กลูโคสเริ่มต้นที่ 100 กรัมต่อลิตร แต่ขณะเดียวกันกลับมีค่าพีเอชที่ลดลงมากกว่าอยู่ที่ 5.4 ไม่มีการพบกรดซัคซินิก แต่พบกรด 3-ไฮดรอกซีไพรูวิกอินิกและกรดอะดิพิคเพียงเล็กน้อย ขณะที่พบปริมาณกลูโคสที่เหลือในวันสุดท้ายที่ 10.83 ± 0.15 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 4.2B) และร้อยละผลได้ในวันสุดท้ายเท่ากับ 21.32 ± 0.30 (รูปที่ 4.3)

ที่ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 200 กรัมต่อลิตรพบว่า ในวันสุดท้ายที่ทำการเพาะเลี้ยงค่าพีเอช อยู่ที่ 5.4 ซึ่งมีค่าเท่ากับเมื่อใช้กลูโคส 150 กรัมต่อลิตร แต่ปริมาณกรดมาลิกที่ได้ที่ค่าสูงสุดคือ 71.36 ± 0.54 กรัมต่อลิตร ไม่พบกรดซัคซินิก ระหว่างการเพาะเลี้ยง แต่พบกรด 3-ไฮดรอกซีไพรูวิกอินิกและกรดอะดิพิคในปริมาณที่น้อย ขณะที่ปริมาณกลูโคสที่เหลือในวันที่ 3 อยู่ที่ 10.61 ± 0.08 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 4.2C) และร้อยละผลได้เท่ากับ 25.29 ± 0.19 (รูปที่ 4.3)

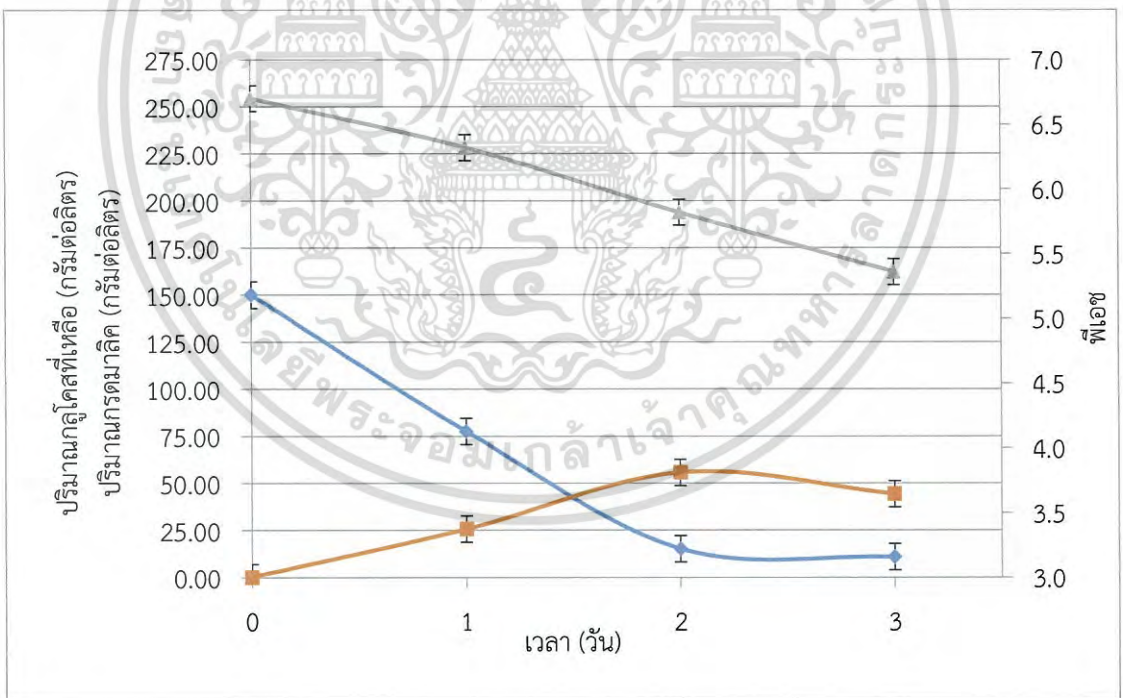
และที่ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 250 กรัมต่อลิตร พบว่าค่า พีเอช ลดลงจนเหลือ 5.4 และได้ปริมาณกรดมาลิกเท่ากับ 68.07 ± 1.80 กรัมต่อลิตร ซึ่งสูงเป็นอันดับ 2 จากทั้ง 4 ความเข้มข้นเป็นรองแค่ที่กลูโคส 200 กรัมต่อลิตรเท่านั้น ไม่พบกรดซัคซินิกและกรด 3-ไฮดรอกซีไพรูวิกอินิกและพบกรดอะดิพิคเล็กน้อย ปริมาณกลูโคสในวันสุดท้ายเหลืออยู่ 80.44 ± 2.13 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 4.2D) ขณะที่ร้อยละผลได้เท่ากับ 26.94 ± 0.71 (รูปที่ 4.3)

ดังนั้นสำหรับไอโซเลต AG2 เมื่อสิ้นสุดการเพาะเลี้ยงพบว่าเมื่อใช้กลูโคสเริ่มต้นที่ความเข้มข้น 200 กรัมต่อลิตร ได้ปริมาณกรดมาลิกสูงสุดคือ 71.36 ± 0.54 กรัมต่อลิตร ขณะที่ร้อยละผลได้สูงสุดเท่ากับ 50.13 ± 3.52 เมื่อใช้ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้นที่ 100 กรัมต่อลิตร และมีค่าอัตราการผลิตเท่ากับ 0.94 0.61 0.99 และ 0.95 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับเมื่อใช้กลูโคสเริ่มต้น 100 150 200 และ 250 กรัมต่อลิตร

จากผลการทดลองที่ได้พบว่า ไอโซเลต AG2 มีปริมาณกรดมาลิกและผลได้สูงสุด เมื่อใช้กลูโคสเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร ดังนั้นจึงทำการคัดเลือกสภาวะนี้ไปทำการศึกษาผลของปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตต่อการผลิตกรดมาลิกต่อไป

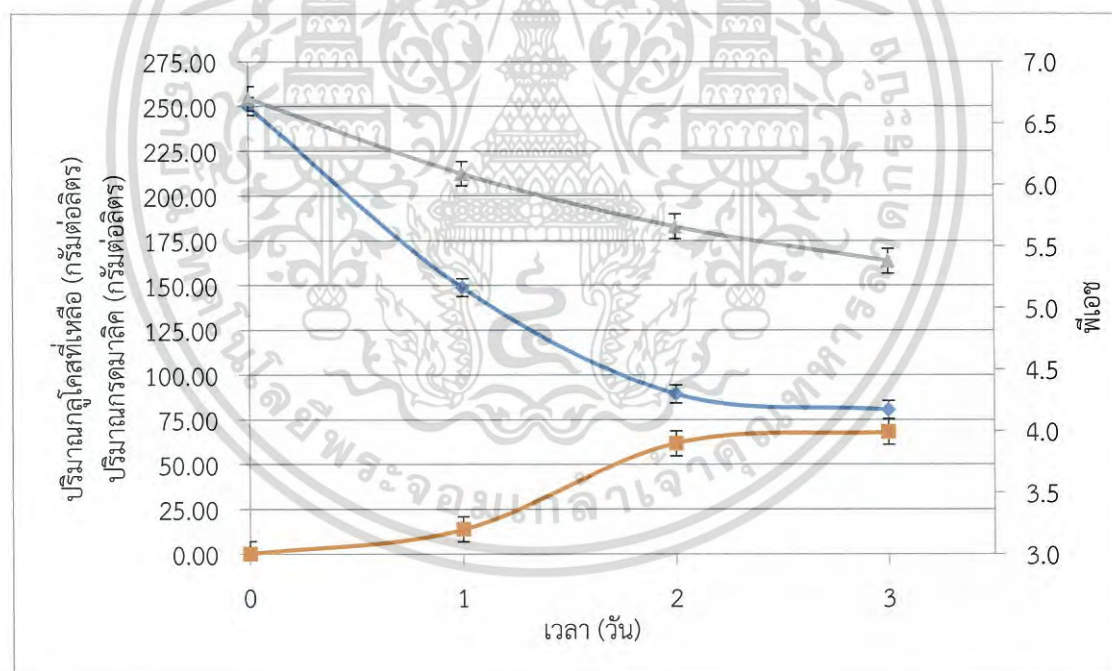
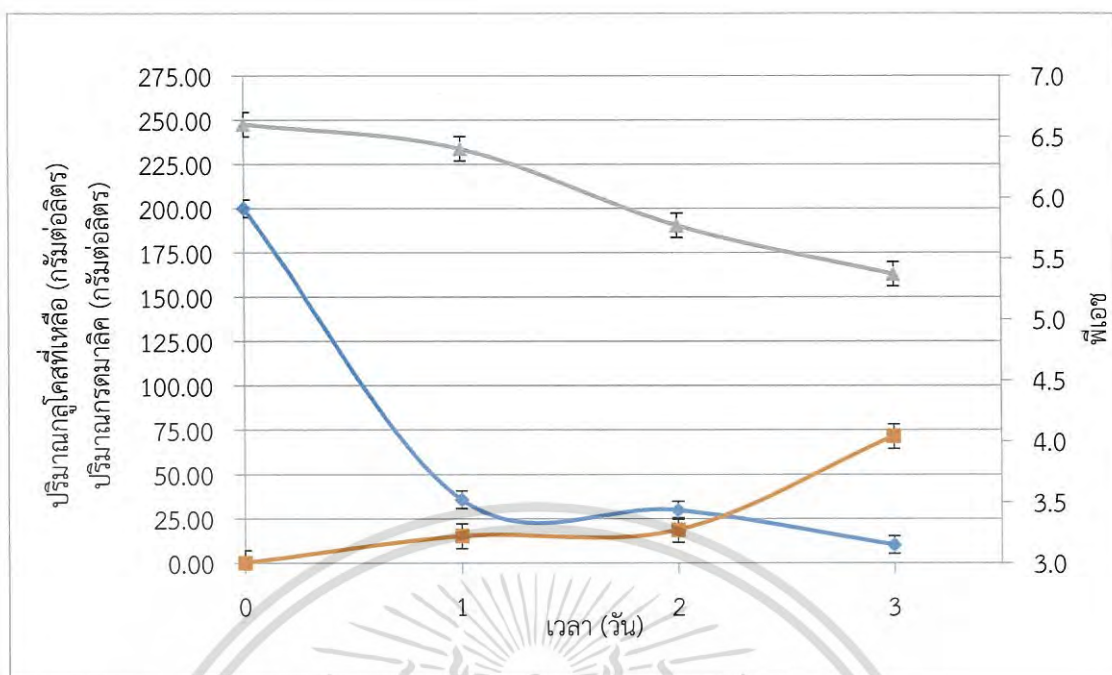


(A)



(B)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

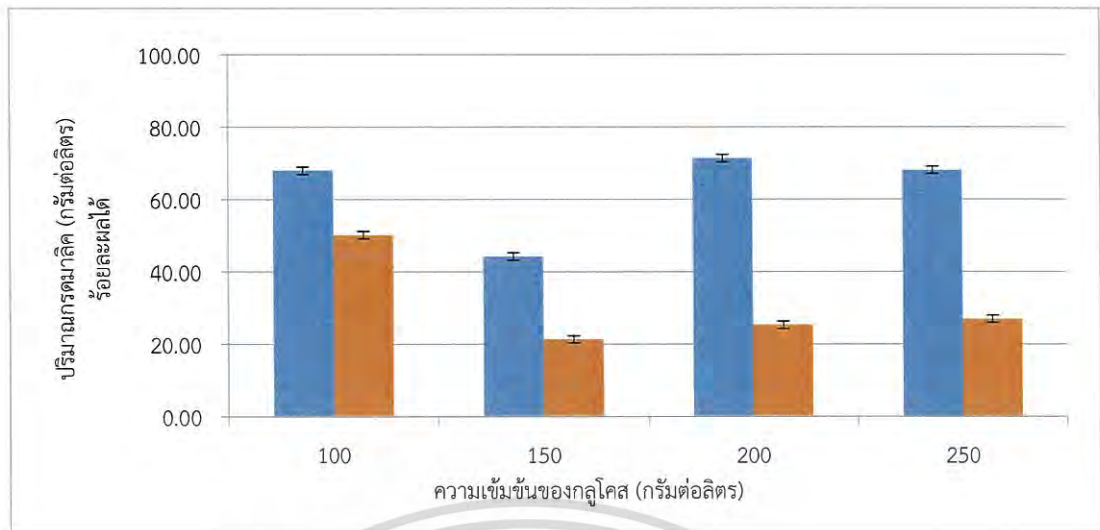


(D)

รูปที่ 4.2

กราฟแสดงปริมาณกลูโคสที่เหลือ กรดมาลิก และพีเอชที่ระยะเวลาต่างๆเมื่อเพาะเลี้ยงไอโซเลต AG2 ในอาหารที่มีกลูโคสความเข้มข้น 100 (A) 150 (B) 200 (C) และ 250 (D) กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนเริ่มต้น โดย ◆ คือปริมาณกลูโคสที่เหลือ (กรัมต่อลิตร) ■ คือปริมาณกรดมาลิก (กรัมต่อลิตร) และ ▲ คือค่า

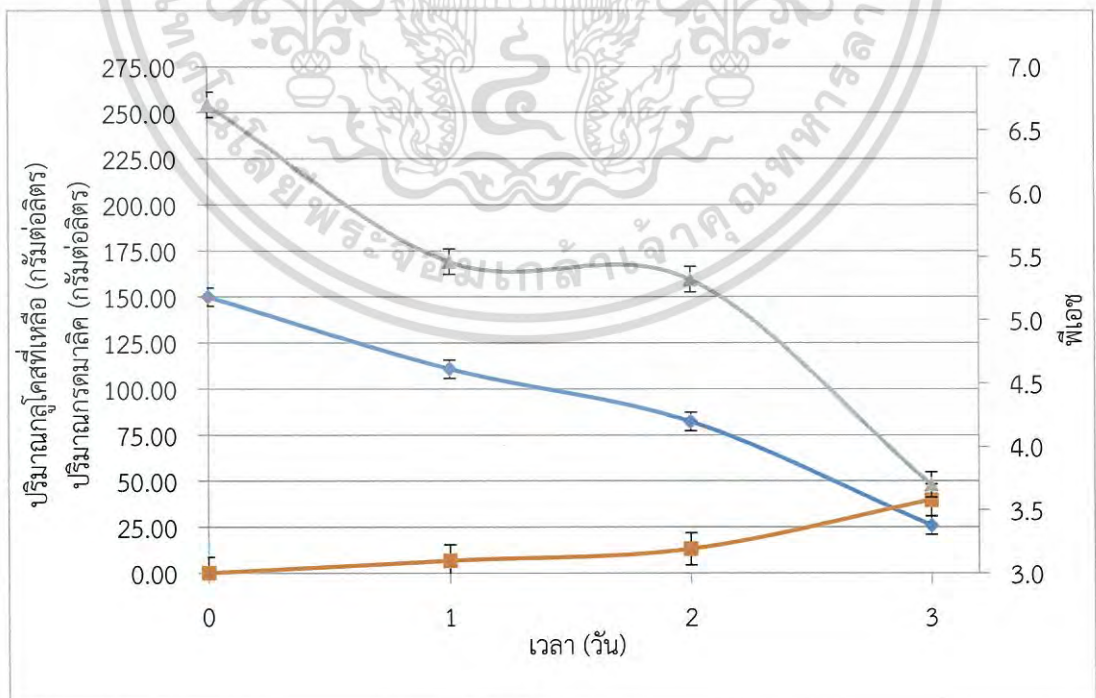
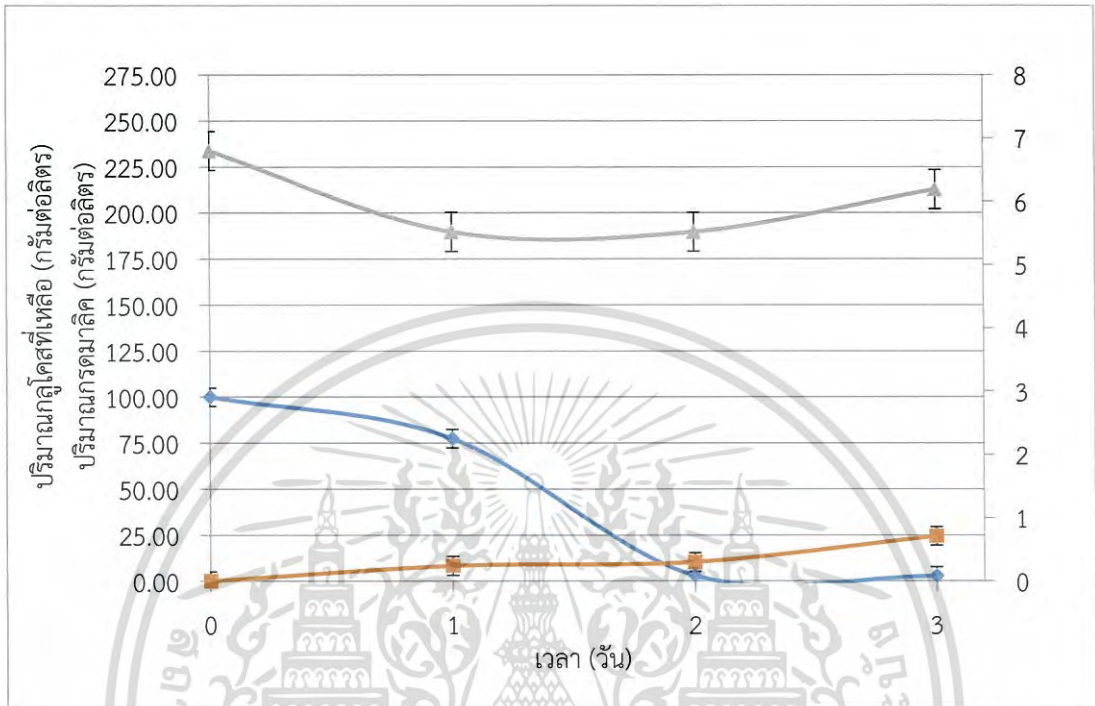
พีเอช เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.3 กราฟแสดงปริมาณกรดมาลิกและร้อยละผลได้ของไอโซเลต AG2 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีกลูโคสความเข้มข้นเริ่มต้น 100 150 200 และ 250 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนโดย ■ คือกรดมาลิก (กรัมต่อลิตร) และ ■ คือร้อยละผลได้

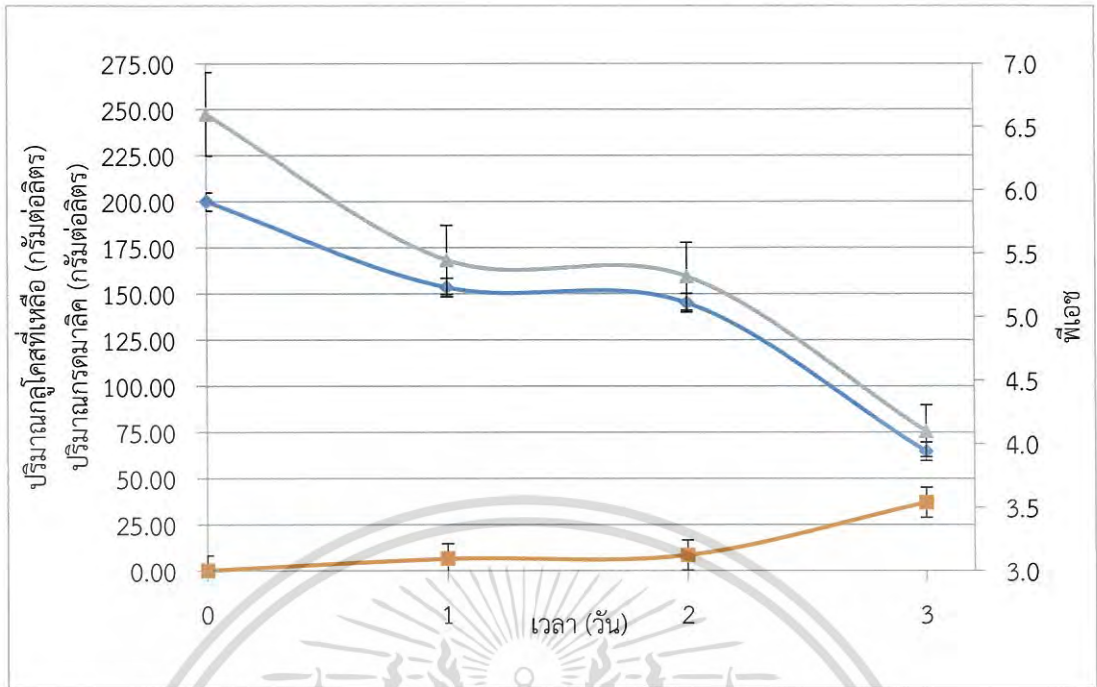
จากรูปที่ 4.4 เมื่อมาตุผลการทดลองที่ได้ของไอโซเลต DG2 ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร พบว่าในระหว่างการเพาะเลี้ยงค่าพีเอช มีการลดลงอย่างต่อเนื่องแต่ในวันที่ 3 ค่าพีเอช สูงขึ้นเป็น 6.2 สำหรับกรดมาลิกที่ผลิตได้สูงสุดอยู่ที่ 24.40 ± 1.44 กรัมต่อลิตร ไม่มีการพบกรด ซัคซินิก และกรด 3-ไฮดรอกซีไพโรฟิโอนิกแต่พบกรดอะดีพิกเพียงเล็กน้อย ปริมาณกลูโคสที่เหลือวันสุดท้ายวัดได้ 2.76 ± 0.16 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 4.4A) และร้อยละผลได้อยู่ที่ 16.84 ± 0.99 (รูปที่ 4.5) ที่ความเข้มข้นกลูโคส 150 กรัมต่อลิตร ค่าพีเอชลดลงต่ำสุดที่ 3.7 และปริมาณกรดมาลิกได้สูงถึง 39.71 ± 0.97 ในวันที่ 3 และไม่มีการพบกรดอื่นๆในระบบ ส่วนปริมาณกลูโคสวันสุดท้ายเหลืออยู่ 25.91 ± 0.63 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 4.4B) ส่วนร้อยละผลได้มีค่าเท่ากับ 21.48 ± 0.52 (รูปที่ 4.5) ที่กลูโคสความเข้มข้น 200 กรัมต่อลิตร พบว่าวันที่ 3 ค่าพีเอชลดลงจนเหลือ 4.1 ขณะที่ปริมาณกรดมาลิกอยู่ที่ 36.85 ± 0.84 กรัมต่อลิตร และไม่พบกรดอื่นๆในระบบ และปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลืออยู่ในวันสุดท้ายอยู่ที่ 64.50 ± 1.46 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 4.4C) ส่วนร้อยละผลได้อยู่ที่ 18.26 ± 0.41 (รูปที่ 4.5) สุดท้ายที่กลูโคสความเข้มข้นเริ่มต้น 250 กรัมต่อลิตร ค่าพีเอชมีการลดลงอย่างเป็นลำดับจนเหลือ 4.0 ปริมาณกรดมาลิกที่วัดได้ในวันที่ 3 อยู่ที่ 37.78 ± 1.45 กรัมต่อลิตร และวันที่ 3 วัดปริมาณกลูโคสที่เหลืออยู่ได้ 71.44 ± 2.75 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 4.4D) และร้อยละผลได้เท่ากับ 14.20 ± 0.55 (รูปที่ 4.5) ดังนั้นสำหรับไอโซเลต DG2 นั้นพบว่าที่กลูโคสเริ่มต้น 150 กรัมต่อลิตร ส่งผลให้ปริมาณกรดมาลิกได้และร้อยละผลได้สูงสุด คือ 39.71 ± 0.97 กรัมต่อลิตร และ 21.48 ± 0.52 ตามลำดับ ค่าอัตราการผลิตของไอโซเลต DG2 เมื่อผ่านไป 72 ชั่วโมง ที่กลูโคสเริ่มต้น 100 150 200 และ 250 กรัมต่อลิตร เท่ากับ 0.34 0.55 0.51 และ 0.52 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับด้านการคำนวณว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากผลที่ได้พบว่าไอโซเลต DG2 จะได้ปริมาณกรดมาลิกและผลได้สูงสุดเมื่อใช้กลูโคสเริ่มต้นที่ 150 กรัมต่อลิตร จึงคัดเลือกสภาวะนี้ไปศึกษาผลของปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตต่อการผลิตกรดมาลิกต่อไป

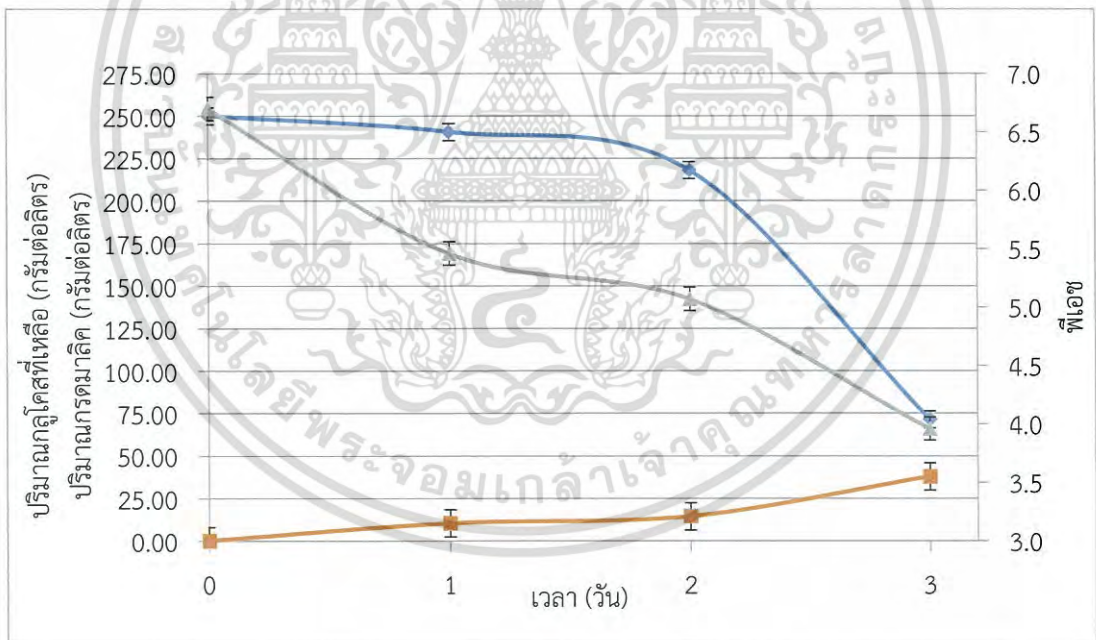


(B)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



(C)

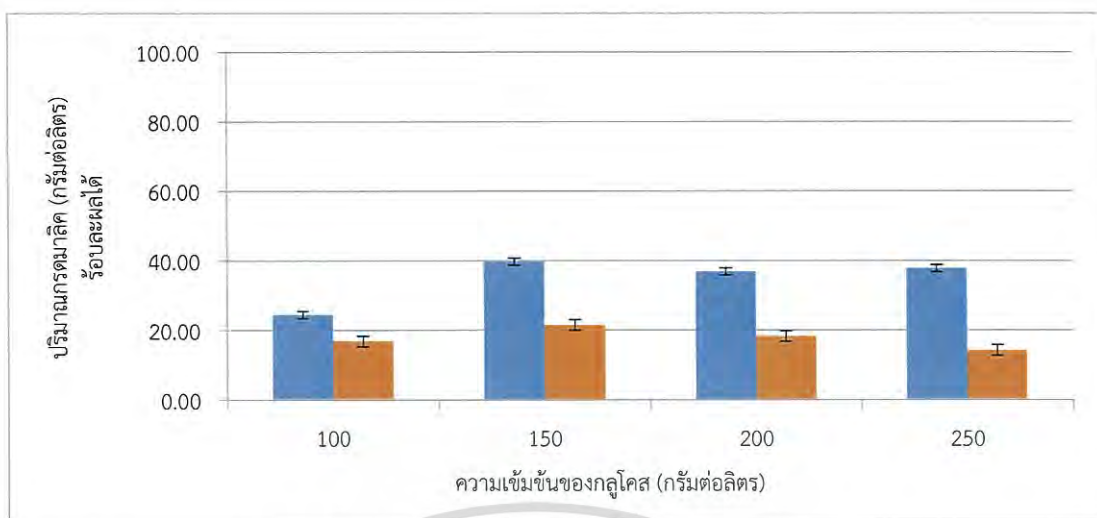


(D)

รูปที่ 4.4

กราฟแสดงปริมาณกลูโคสที่เหลือ กรดมาลิก และพีเอชที่ระยะเวลาต่างๆเมื่อเพาะเลี้ยงไอโซเลต DG2 ในอาหารที่มีกลูโคสความเข้มข้น 100 (A) 150 (B) 200 (C) และ 250 (D) กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนเริ่มต้น โดย ◆ คือปริมาณกลูโคสที่เหลือ (กรัมต่อลิตร) ■ คือปริมาณกรดมาลิก (กรัมต่อลิตร) และ ▲ คือค่าพีเอช

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.5 กราฟแสดงปริมาณกรดมาลิกและร้อยละผลได้ของไอโซเลต DG2 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีกลูโคสความเข้มข้นเริ่มต้น 100 150 200 และ 250 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน โดย ■ คือกรดมาลิก (กรัมต่อลิตร) และ ■ คือร้อยละผลได้

ในปัจจุบันกรดมาลิกยังได้รับความสนใจเนื่องจากใช้เป็นสารปรุงแต่งรสชาติทั้งในอาหารและเครื่องดื่มต่างๆ ทั้งยังเป็นโครงสร้างพื้นฐานที่สำคัญในการผลิตพลาสติก และยังมีการนำเข้ากรดมาลิกจากต่างประเทศเนื่องจากไม่สามารถผลิตในประเทศได้อย่างเพียงพอ สำหรับจุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตกรดมาลิกส่วนใหญ่จะใช้เชื้อรา ซึ่งใช้ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงมากกว่าแบคทีเรีย เช่น จากการศึกษาของ Battat และคณะ (1990) หาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดมาลิก โดยใช้ *Aspergillus flavus* ในถังหมักแบบปั่นกววน เป็นเวลา 160 ชั่วโมง โดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร ถึงจะได้ปริมาณกรดมาลิก 39.0 กรัมต่อลิตร และจากการวิจัยของ Zou และคณะ (2015) ได้ทำการศึกษาผลของปริมาณกลูโคสเริ่มต้นต่อการผลิตกรดมาลิกโดยใช้ *Aureobasidium pullulan* CCTCCM 2012223 ในระดับฟลาสก์ โดยใช้ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงถึง 120 ชั่วโมง ใช้ปริมาณกลูโคสเริ่มต้นเท่ากับ 110 กรัมต่อลิตร ปริมาณกรดมาลิกที่ได้เท่ากับ 15.27 กรัมต่อลิตร

ทั้ง 2 งานวิจัยข้างต้น เชื้อราที่นำมาศึกษาคัดแยกได้จากแหล่งธรรมชาติ จึงมีการพัฒนาปรับปรุงสายพันธุ์ผ่านการตัดต่อยีน เพื่อให้จุลินทรีย์สามารถผลิตกรดมาลิกได้มากขึ้น เช่น จากการศึกษาของ Brown และคณะ (2013) ได้ทำการปรับปรุงสายพันธุ์ของ *Aspergillus oryzae* ได้ 2 สายพันธุ์คือ *A. oryzae* SaMF 2103a-68 Z ปรับปรุงที่ตำแหน่งยีน *C4t318* (ควบคุมการขนส่งมาเลตจากไซโทซอลออกนอกเซลล์) *MDH* (ควบคุมการสร้างเอนไซม์มาเลตดีไฮโดรจีเนส) และ *PYC* (ควบคุมการสร้างเอนไซม์ไพรวูเวทคาร์บอกซิเลส) ส่วนอีกสายพันธุ์คือ *A. oryzae* ShTh1040-22 ปรับปรุงที่ตำแหน่งยีน *C4T318* (ควบคุมการขนส่งมาเลตจากไซโทซอลออกนอกเซลล์) โดยใช้กลูโคส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็นแหล่งคาร์บอน 100 กรัมต่อลิตร พบว่าปริมาณกรดมาลิกที่ได้เท่ากับ 59.10 และ 45.20 กรัมต่อลิตร

ในการศึกษานี้ใช้แบคทีเรีย 2 ไอโซเลตได้แก่ AG2 และ DG2 ซึ่งคัดแยกได้จากธรรมชาติ พบว่าที่ 72 ชั่วโมง ที่ไอโซเลต AG2 ปริมาณกรดมาลิกสูงสุดเท่ากับ 71.36 ± 0.54 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้กลูโคสเริ่มต้น 200 กรัมต่อลิตร และมีค่าอัตราการผลิตเท่ากับ 0.99 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง แต่ร้อยละผลได้สูงสุดอยู่ที่ 50.13 ± 3.52 เมื่อใช้กลูโคสเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร ในขณะที่ไอโซเลต DG2 ผลิตกรดมาลิกได้เท่ากับ 39.71 ± 0.97 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีค่าอัตราการผลิตเท่ากับ 0.55 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง โดยพบว่าปริมาณกรดมาลิกที่ไอโซเลต AG2 และ DG2 ผลิตได้มีค่าสูงกว่าการใช้เชื้อรา อีกทั้งยังใช้ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงน้อยกว่า



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5 ผลของปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตต่อการผลิตกรดมาลิก

การทดลองในหัวข้อ 4.4 ได้ทำการศึกษาความเข้มข้นเริ่มต้นของกลูโคสที่มีผลต่อการผลิตกรดมาลิก พบว่าไอโซเลต AG2 เมื่อใช้กลูโคสเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร ผลิตภัณฑ์กรดมาลิกได้สูง 67.92 ± 4.78 กรัมต่อลิตรและร้อยละผลได้สูงสุดอยู่ที่ 50.13 ± 3.52 ในขณะที่ไอโซเลต DG2 ปริมาณกรดมาลิกและร้อยละผลได้สูงสุดคือ 39.71 ± 0.97 กรัมต่อลิตร และ 21.48 ± 0.52 ตามลำดับ ดังนั้นจึงได้เลือกสภาวะเหล่านี้มาทำการศึกษาผลของปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตที่ความเข้มข้น 10 30 และ 50 กรัมต่อลิตร ต่อการผลิตกรดมาลิก

ทำการเพาะเลี้ยงไอโซเลตในสูตรอาหารเหลว shaker culture medium โดยไอโซเลต AG2 ใช้กลูโคสเริ่มต้นความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร ส่วนไอโซเลต DG2 ใช้กลูโคสเริ่มต้นที่ 150 กรัมต่อลิตร (Tabuchi และคณะ, 1981) และทำการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตที่ความเข้มข้นต่างกันคือ 10 30 และ 50 กรัมต่อลิตร ทำการเพาะเลี้ยงที่สภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที และระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง AG2 และ DG2 ต่างกันคือ 3 และ 6 วัน ตามลำดับ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างน้ำเลี้ยงตั้งแต่เริ่มลงหัวเชื้อในฟลาสก์สำหรับการผลิตกรด และเก็บต่อไปทุกๆ 24 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างที่เก็บได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 9000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาทีเพื่อแยกเอาตะกอนเซลล์ออก และนำส่วนใสที่ได้ไปกรองด้วยเมมเบรนที่มีรูพรุนขนาด 0.02 ไมครอน เพื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณกรดมาลิกและสารเมตาบอไลต์อื่นๆด้วยเครื่อง HPLC พร้อมทั้งทำการวัดค่าพีเอช และวิเคราะห์น้ำตาลด้วยวิธีเอ็นเอส ผลการทดลองที่ได้เป็นไปตามตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.5 แสดงผลของปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตเริ่มต้นที่ความเข้มข้น 10 30 และ 50 กรัมต่อลิตรต่อปริมาณกรดมาลิก ร้อยละผลได้ และอัตราการผลิตของไอโซเลต AG2 และ DG2

| ไอโซเลต | ความเข้มข้นกลูโคส (กรัมต่อลิตร) | ความเข้มข้น แคลเซียม คาร์บอเนต | กรดมาลิก (กรัมต่อลิตร) | ร้อยละผลได้ | อัตราการผลิต (กรัมต่อลิตร ต่อชั่วโมง) |
|---------|------------------------------------|--------------------------------------|---------------------------|------------------|---|
| AG2 | 100 | 10 | 25.00 ± 6.10 | 20.98 ± 5.12 | 0.35 |
| | | 30 | 3.28 ± 0.23 | 2.21 ± 0.15 | 0.01 |
| | | 50 | 1.30 ± 0.07 | 0.85 ± 0.05 | 0.03 |
| DG2 | 150 | 10 | 3.39 ± 0.21 | 1.64 ± 0.10 | 0.02 |
| | | 30 | 2.12 ± 0.23 | 1.75 ± 0.09 | 0.09 |
| | | 50 | 4.02 ± 0.03 | 2.11 ± 0.02 | 0.03 |

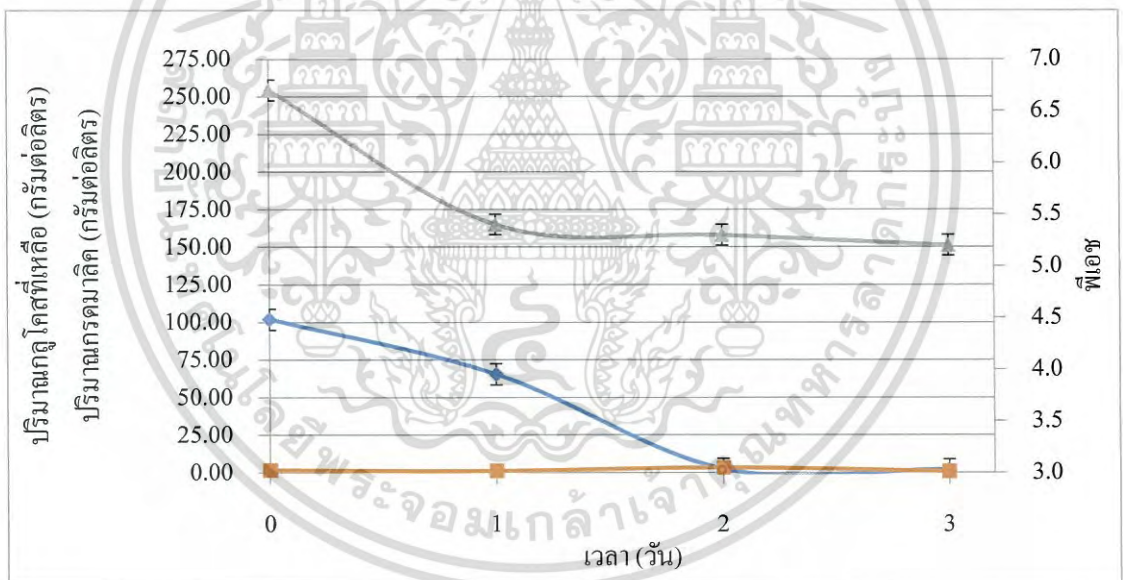
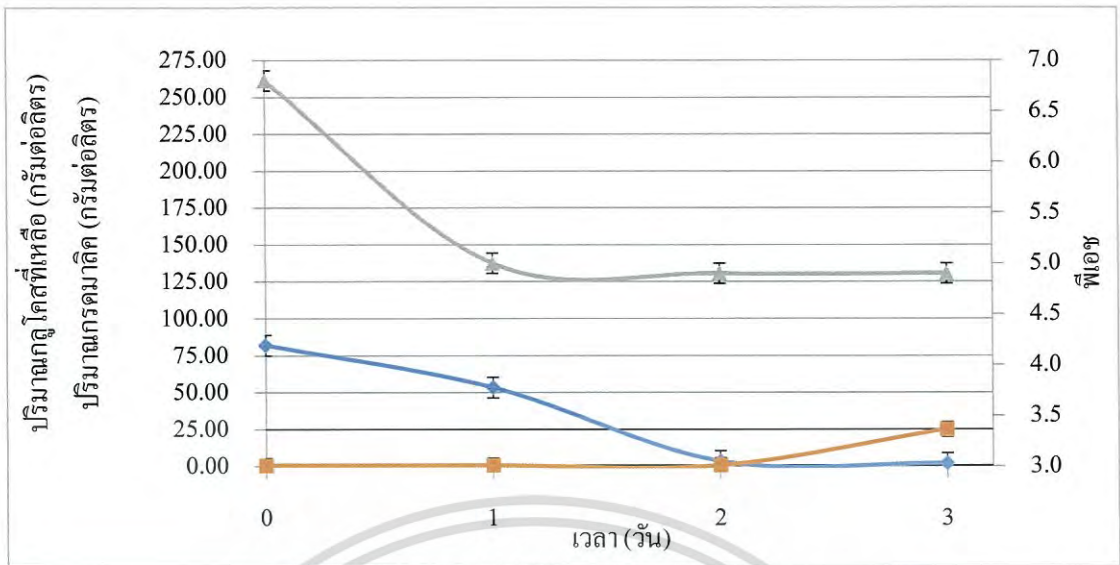
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากตารางที่ 4.5 แสดงให้เห็นว่า ทีไอโซเลต AG2 เมื่อใช้กลูโคสเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร ที่ แคลเซียมคาร์บอเนตเริ่มต้น 10 30 และ 50 กรัมต่อลิตร พบว่าปริมาณกรดมาลิกสูงสุดอยู่ที่ 25.00 ± 6.10 3.28 ± 0.23 และ 1.30 ± 0.07 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ร้อยละผลได้และอัตราการผลิตสูงสุด เท่ากับ 20.98 ± 5.12 และ 0.35 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ เมื่อใช้แคลเซียมคาร์บอเนตเริ่มต้น 10 กรัมต่อลิตร

ไอโซเลต DG2 เมื่อใช้กลูโคสเริ่มต้น 150 กรัมต่อลิตร และทำการเติมแคลเซียมคาร์บอเนต 10 30 และ 50 กรัมต่อลิตร พบว่า ปริมาณกรดมาลิกและร้อยละผลได้จะสูงสุดเมื่อใช้แคลเซียมคาร์บอเนตเริ่มต้น 50 กรัมต่อลิตร เท่ากับ 4.02 ± 0.03 กรัมต่อลิตร และ 2.11 ± 0.02 ตามลำดับ แต่อัตราการผลิตสูงสุดเท่ากับ 0.09 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ที่แคลเซียมคาร์บอเนต 30 กรัมต่อลิตร

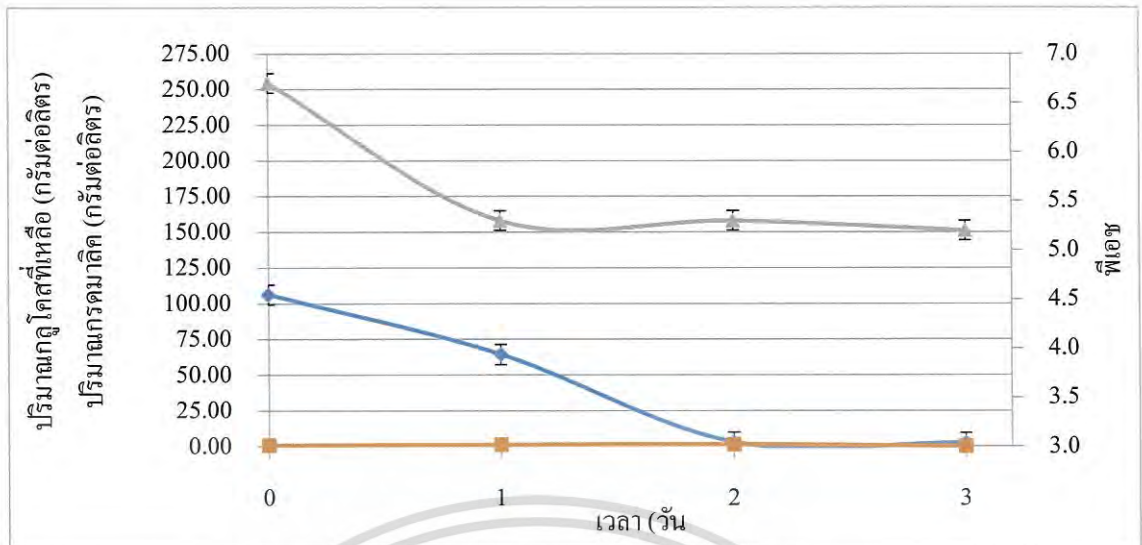
เมื่อนำค่าน้ำตาลที่วัดได้ทุกๆ 24 ชั่วโมง ค่าปริมาณกรดมาลิกที่เพิ่มขึ้น และค่าพีเอชที่ลดลง มาทำการวาดกราฟแสดงความสัมพันธ์ของไอโซเลต AG2 ที่กลูโคสเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร ดังรูปที่ 4.6 ในกราฟ A เมื่อใช้แคลเซียมคาร์บอเนต 10 กรัมต่อลิตร ในระยะเวลา 3 วัน ค่าน้ำตาลลดลงอย่างเป็นลำดับตั้งแต่ 81.90 ± 0.52 53.31 ± 3.57 3.43 ± 0.47 และ 1.92 ± 0.47 กรัมต่อลิตร แสดงให้เห็นว่าน้ำตาลในระบบเกือบหมด ในขณะที่ปริมาณกรดมาลิกในสองวันแรกใกล้เคียง 0 แต่ในวันที่ 3 ได้สูงสุดที่ 25.00 ± 6.10 กรัมต่อลิตร ขณะที่ค่าพีเอชเริ่มต้นที่ 6.8 และค่าสุดท้ายที่ 4.9 สำหรับกราฟ B ที่แคลเซียมคาร์บอเนต 30 กรัมต่อลิตร ปริมาณน้ำตาลในระบบลดลงตั้งแต่ 101.86 ± 0.54 65.36 ± 1.99 2.38 ± 0.17 และ 1.88 ± 0.12 กรัมต่อลิตรตามลำดับ ขณะที่กรดมาลิกได้สูงสุดแค่ 3.28 กรัมต่อลิตรในวันที่ 2 ขณะที่ค่าพีเอชมีการลดลง คือ 6.7 5.4 5.3 และ 5.2 ตามลำดับ สำหรับกราฟ C เมื่อใช้แคลเซียมคาร์บอเนต 50 กรัมต่อลิตร ปริมาณน้ำตาลในวันสุดท้ายเหลือ 2.53 ± 0.06 กรัมต่อลิตร และกรดมาลิกสูงสุดเท่ากับ 1.30 ± 0.07 กรัมต่อลิตรในวันที่ 2 ขณะที่ค่าพีเอชวันสุดท้ายอยู่ที่ 5.2

เมื่อทำการเปรียบเทียบแนวโน้มต่างๆของทั้ง 3 ความเข้มข้น จากรูปที่ 4.6 ปริมาณน้ำตาลที่เหลืออยู่ในระบบไม่แตกต่างกัน แต่กรดมาลิกที่ได้มีปริมาณที่แตกต่างกันมาก พบว่าที่แคลเซียมคาร์บอเนต 10 กรัมต่อลิตร ได้ปริมาณกรดมาลิกสูงสุด 25.00 ± 6.10 กรัมต่อลิตร ขณะที่อีก 2 ความเข้มข้นกรดมาลิกใกล้เคียงศูนย์ เมื่อเปรียบเทียบค่าพีเอชของทั้ง 3 ความเข้มข้นถ้าพิจารณาแยกเป็นรายวันพบว่า ที่แคลเซียมคาร์บอเนตเริ่มต้น 10 กรัมต่อลิตร ค่าพีเอชมีแนวโน้มตกลงมามากกว่า เริ่มต้นที่ 6.8 เป็น 5.0 และสองวันสุดท้ายคงที่ที่ 4.9 ขณะที่อีก 2 ความเข้มข้นคือ 30 และ 50 กรัมต่อลิตร ซึ่งสัมพันธ์กับปริมาณกรดมาลิกที่เพิ่มสูงขึ้น



(B)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

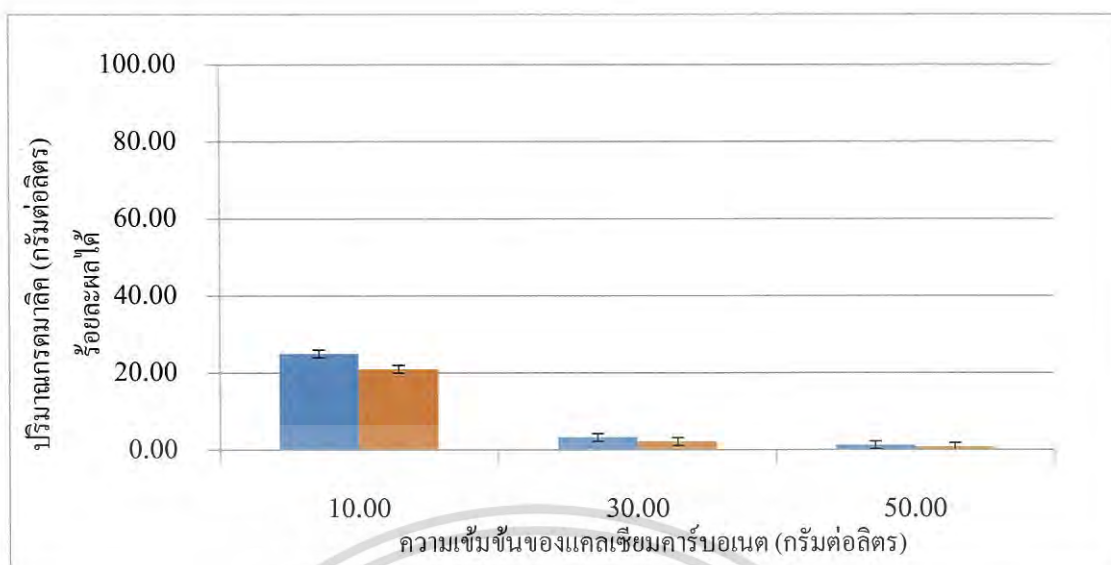


(C)

รูปที่ 4.6

กราฟแสดงปริมาณกลูโคสที่เหลือ กรดมาลิก และพีเอชที่ระยะเวลาต่างๆเมื่อเพาะเลี้ยงไอโซเลต AG2 ในอาหารที่มีแคลเซียมคาร์บอเนตความเข้มข้นเริ่มต้น 10 (A) 30 (B) และ 50 (C) กรัมต่อลิตร และใช้กลูโคสเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน โดย \blacklozenge คือปริมาณกลูโคสที่เหลือ (กรัมต่อลิตร) \blacksquare คือปริมาณกรดมาลิก (กรัมต่อลิตร) และ \blacktriangle คือค่าพีเอช

เมื่อนำปริมาณกรดมาลิกและร้อยละผลได้ของแคลเซียมคาร์บอเนตทั้ง 3 ความเข้มข้นวาดกราฟแท่งเพื่อเปรียบเทียบ ดังรูปที่ 4.7 พบว่าที่ 10 กรัมต่อลิตร กรดมาลิกและร้อยละผลได้สูงสุดเท่ากับ 25.00 ± 6.10 กรัมต่อลิตร และ 20.98 ± 5.12 ตามลำดับ ในขณะที่ความเข้มข้น 30 และ 50 กรัมต่อลิตร มีค่าน้อยกว่าและลดลงตามความเข้มข้น จึงแสดงให้เห็นว่าเมื่อใช้กลูโคสเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตรร่วมกับแคลเซียมคาร์บอเนต 10 กรัมต่อลิตร ได้ทั้งกรดมาลิกและผลได้สูงสุด



รูปที่ 4.7 กราฟแสดงปริมาณกรดมาลิกและร้อยละผลได้ของไอโซเลต AG2 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีกลูโคสความเข้มข้นเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และใช้ปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนต 10 30 และ 50 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดย ■ คือ กรดมาลิก (กรัมต่อลิตร) และ ■ คือร้อยละผลได้

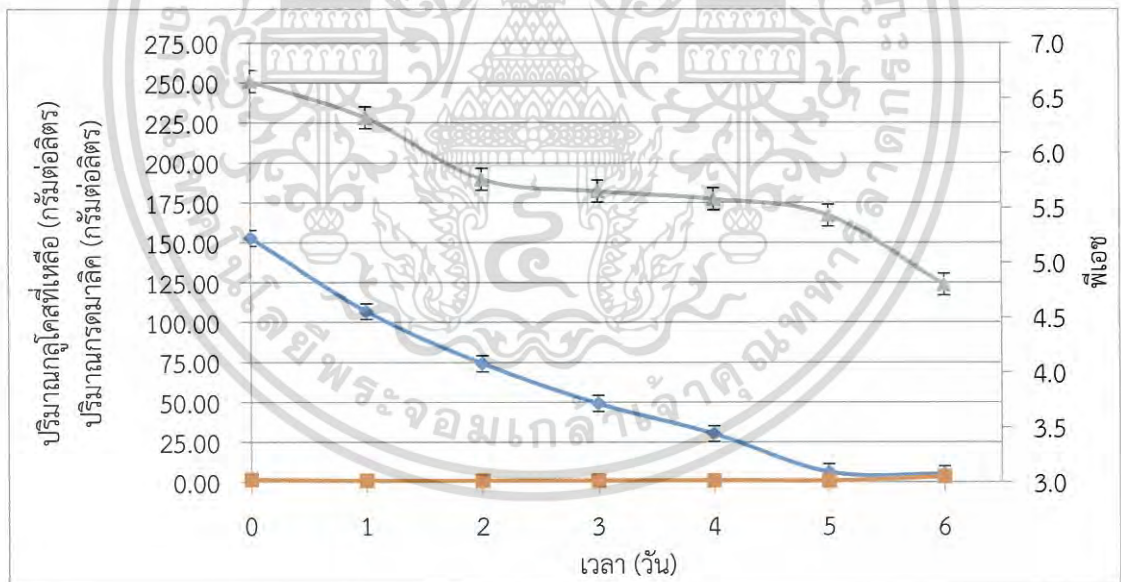
สำหรับไอโซเลต DG2 ทำการเพาะเลี้ยง 6 วัน โดยใช้กลูโคสเริ่มต้น 150 กรัมต่อลิตร ร่วมกับแคลเซียมคาร์บอเนต 3 ความเข้มข้น ได้แก่ 10 30 และ 50 กรัมต่อลิตร และเก็บตัวอย่างทุกๆ 24 ชั่วโมง พบว่าแนวโน้มปริมาณน้ำตาล กรดมาลิก และร้อยละผลได้แสดงดังรูปที่ 4.8

ในรูป 4.8A ปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตที่ใช้คือ 10 กรัมต่อลิตร พบว่าปริมาณน้ำตาลเริ่มจาก 152.76 ± 8.95 กรัมต่อลิตร และลดลงอย่างต่อเนื่องถึง 4.87 ± 0.30 กรัมต่อลิตรในวันสุดท้าย ซึ่งสวนทางกับปริมาณกรดมาลิกที่ได้สูงสุดแค่ 3.39 ± 0.21 กรัมต่อลิตร สำหรับค่าพีเอชในวันสุดท้ายอยู่ที่ 6.3 ที่ความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร (4.8B) พบว่าใน 24 ชั่วโมงแรก DG2 มีการใช้น้ำตาลมาก เริ่มต้นที่ 146.95 ± 3.89 เหลือเพียง 65.45 ± 7.01 กรัมต่อลิตรเท่านั้น จากนั้นก็ลดลงเรื่อยๆ จนคงที่ในวันที่ 4 และ 5 โดยเหลือน้ำตาลในระบบประมาณ 4 กรัมต่อลิตร สำหรับปริมาณกรดมาลิกที่ได้มีค่าต่ำ โดยสูงสุดเมื่อผ่านไป 24 ชั่วโมงที่ 2.12 ± 0.23 และลดลงจนเหลือ 1.10 ± 0.09 กรัมต่อลิตร ในวันสุดท้าย สำหรับค่าพีเอชเริ่มต้นที่ 6.7 และลดลงตามลำดับถึง 5.9 ในวันที่ 2 หลังจากนั้นค่าพีเอชค่อนข้างคงที่ใกล้เคียง 5.7 และเมื่อใช้แคลเซียมคาร์บอเนตเริ่มต้น 50 กรัมต่อลิตร (รูป 4.8C) พบว่าปริมาณน้ำตาลที่ถูกใช้ใน 24 ชั่วโมงน้อยมาก เนื่องจากเส้นกราฟค่อนข้างคงที่ เมื่อน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 150.90 ± 2.95 ลดลงเหลือ 85.95 ± 0.20 กรัมต่อลิตร เมื่อผ่านไป 2 วัน จากนั้นก็ลดลงเรื่อยๆ ในวันสุดท้ายวัดน้ำตาลที่เหลือในระบบได้เท่ากับ 22.99 ± 0.20 กรัมต่อลิตร (ซึ่งมีค่าสูง

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

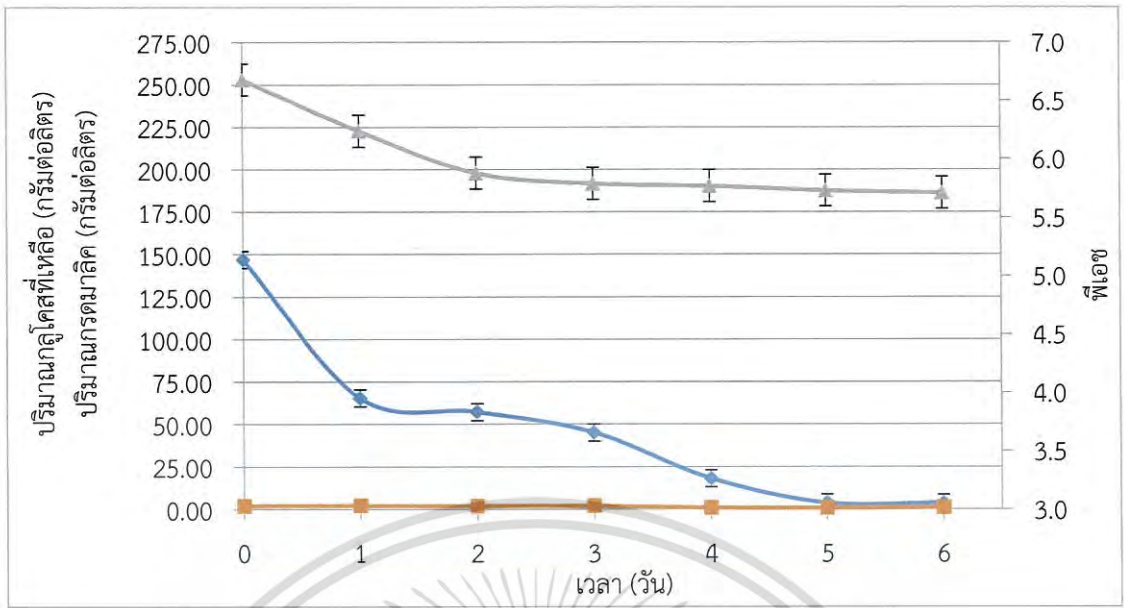
กว่าที่ 10 และ 30 กรัมต่อลิตร) สำหรับกรดมาลิกได้สูงสุดในวันสุดท้ายเท่ากับ 4.02 ± 0.03 กรัมต่อลิตร และค่าพีเอชที่วัดได้เริ่มต้นจาก 6.7 วันที่ 1 ลดเหลือ 6.4 วันที่ 2 ลดเหลือ 5.9 หลังจากนั้นค่อยๆลดลงทีละน้อยจนวันสุดท้ายวัดค่าพีเอชได้เท่ากับ 5.7

เมื่อเปรียบเทียบแคลเซียมคาร์บอเนตทั้ง 3 ความเข้มข้น พบว่าที่ความเข้มข้น 10 และ 30 กรัมต่อลิตร น้ำตาลเหลือใกล้เคียงกันคือ 4.87 ± 0.30 และ 3.63 ± 0.30 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ แต่ความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตรเหลือน้ำตาลสูงสุดเท่ากับ 22.99 ± 0.20 กรัมต่อลิตร แต่ปริมาณกรดมาลิกที่ได้กลับสูงกว่าเท่ากับ 4.02 ± 0.03 กรัมต่อลิตร สำหรับค่าพีเอช เมื่อเริ่มต้นที่ 5.7 เท่ากัน พบว่าที่ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร ค่าพีเอชลดลงอย่างต่อเนื่องจนถึงวันที่ 2 แล้วลดลงทีละน้อยจนถึงวันที่ 5 แล้วค่าพีเอชตกลงมากในวันสุดท้ายเหลือแค่ 4.8 ที่ความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตรค่าพีเอชนั้นลดลงอย่างต่อเนื่องจนถึงวันที่ 2 เช่นเดียวกับความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร แต่หลังจากนั้นค่าพีเอชค่อนข้างคงที่ในช่วง 5.7 และที่ความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร พบว่าการลดลงของพีเอชใกล้เคียงกับที่ความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร คือลดลงอย่างต่อเนื่องใน 2 วันแรก หลังจากนั้นค่าพีเอชค่อนข้างคงที่ประมาณ 5.7

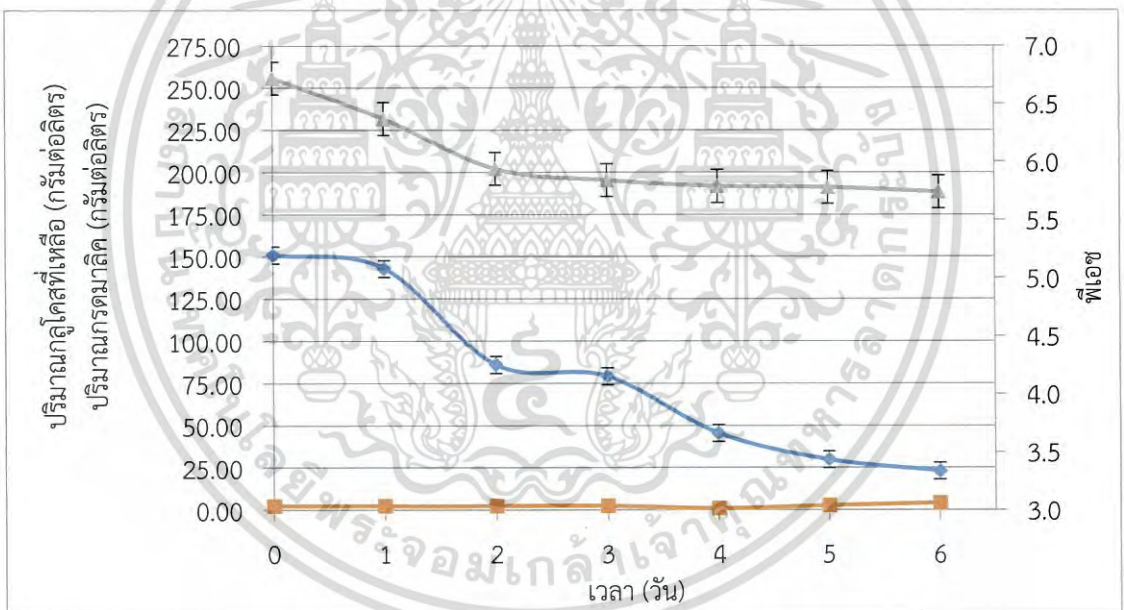


(A)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



(B)



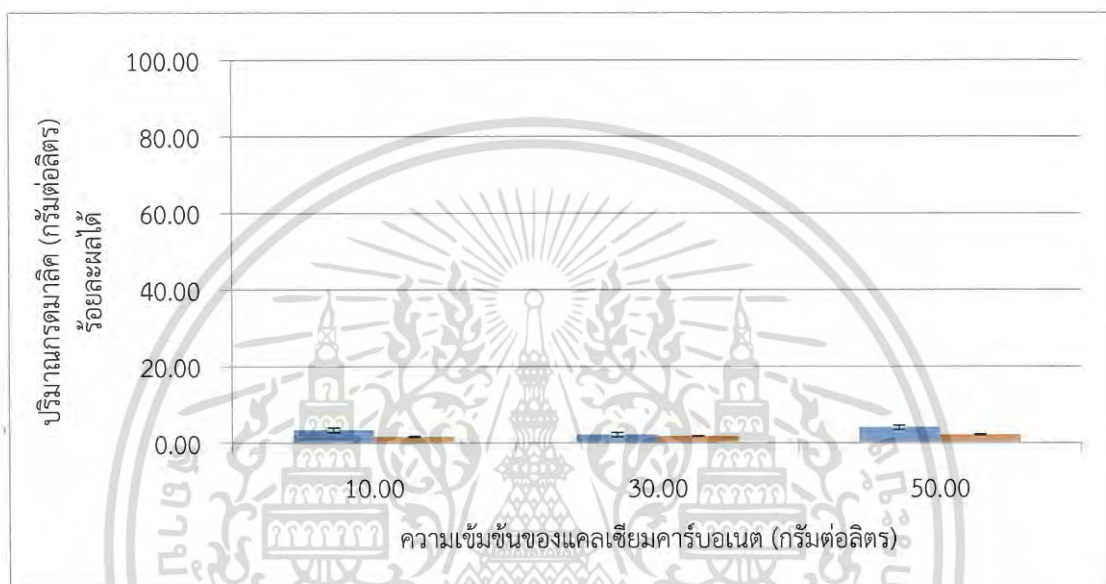
(C)

รูปที่ 4.8

กราฟแสดงปริมาณกลูโคสที่เหลือ กรดมาลิก และพีเอชที่ระยะเวลาต่างๆเมื่อเพาะเลี้ยงไอโซเลต DG2 ในอาหารที่มีแคลเซียมคาร์บอเนตความเข้มข้นเริ่มต้น 10 (A) 30 (B) และ 50 (C) กรัมต่อลิตร และใช้กลูโคสเริ่มต้น 150 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน โดย ◆ คือปริมาณกลูโคสที่เหลือ (กรัมต่อลิตร) ■ คือปริมาณกรดมาลิก (กรัมต่อลิตร) และ ▲ คือค่าพีเอช

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อนำค่ากรดมาลิกที่ให้กับผลได้มาทำการเปรียบเทียบทั้ง 3 ความเข้มข้น ดังรูปที่ 4.9 พบว่าที่แคลเซียมคาร์บอเนต 50 กรัมต่อลิตร มีปริมาณกรดมาลิกและร้อยละผลได้สูงที่สุดเท่ากับ 4.02 ± 0.03 กรัมต่อลิตร และ 2.11 ± 0.02 ตามลำดับ ปริมาณกรดมาลิกรองลงมาคือ ความเข้มข้น 10 (3.39 ± 0.21 กรัมต่อลิตร) และ 30 (2.12 ± 0.23 กรัมต่อลิตร) กรัมต่อลิตรตามลำดับ ส่วนร้อยละผลได้รองลงมาคือที่ความเข้มข้น 30 (1.75 ± 0.19) และ 10 (1.64 ± 0.10) กรัมต่อลิตร ตามลำดับ



รูปที่ 4.9

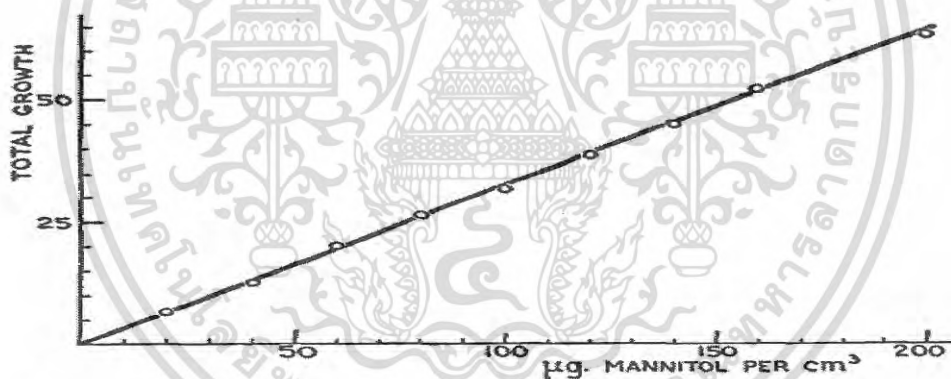
กราฟแสดงปริมาณกรดมาลิกและร้อยละผลได้ของไอโซเลต DG2 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีกลูโคสความเข้มข้นเริ่มต้น 150 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และใช้ปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนต 10 30 และ 50 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อ ■ คือ กรดมาลิก (กรัมต่อลิตร) และ ■ คือร้อยละผลได้

Zambanini และคณะ (2016) ได้ทำการศึกษาผลของแคลเซียมคาร์บอเนตความเข้มข้นต่างๆ พบว่าที่ความเข้มข้น 33 กรัมต่อลิตร ส่งผลให้ปริมาณกรดมาลิกสูงถึง 5.3 ± 0.3 กรัมต่อลิตร เมื่อผ่านไป 96 ชั่วโมง แต่เมื่อมาดูผลของไอโซเลต AG2 ที่กลูโคสเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร พบว่าปริมาณกรดมาลิกได้สูงสุด 25.00 ± 6.10 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้แคลเซียมคาร์บอเนตความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร เมื่อผ่านไป 72 ซึ่งปริมาณกรดมาลิกที่ได้สูงกว่าและเวลาในการเพาะเลี้ยงสั้นกว่า และ DG2 กลูโคสเริ่มต้น 150 กรัมต่อลิตร กรดมาลิกได้ 4.02 ± 0.03 กรัมต่อลิตร ที่ความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากผลข้างต้นพอสามารถบอกแนวโน้มปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตที่เหมาะสมสำหรับไอโซเลต AG2 และ DG2 ได้อย่างคร่าวๆ แต่อย่างไรก็ตามพบว่าปริมาณกรดมาลิกที่ทั้งสองไอโซเลตผลิตได้มีค่าน้อยมากเมื่อเทียบกับการทดสอบความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น เนื่องจากปริมาณหัวเชื้อ (เทียบโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร) อัตราการใช้น้ำตาล และค่าพีเอชที่ลดลง ยังมีแนวโน้มใกล้เคียงเดิมในสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบเดิม จึงต้องทำการศึกษาปัจจัยอื่นๆที่เกี่ยวข้องต่อไป

จะเห็นว่าในการศึกษาปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดมาลิก ปริมาณกรดมาลิกที่ไอโซเลต AG2 และ DG2 ผลิตได้ลดลงอย่างมากทั้งๆที่ควบคุมสภาวะการเพาะเลี้ยงต่างๆ เช่นเดิม Monod (1949) ได้ทำการศึกษาการเจริญของแบคทีเรีย โดยแบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษาส่วนใหญ่เป็นเคโมออร์กาโนโทรฟที่ต้องการสารประกอบอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน มีตัวรับไฮโดรเจน ไอออน อนินทรีย์ และคาร์บอนไดออกไซด์ โดยทำการศึกษาประสิทธิภาพของสารต่างๆที่ถูกจำกัดปริมาณและดูความต้องการใช้ของแบคทีเรีย ซึ่งแบคทีเรียจะเจริญเติบโตเมื่อส่วนประกอบของอาหารไม่ซับซ้อน ดังนั้นปริมาณสารอาหารที่จำเป็นในสูตรอาหารจะมีปริมาณเกินกว่าความต้องการใช้ และเมื่อมีการจำกัดสารอาหารในปริมาณที่น้อยลง การเจริญของแบคทีเรียจึงลดลงตามไปด้วยดังรูปที่ 4.10



รูปที่ 4.10 การเจริญของ *Escherichia coli* ในอาหารที่ถูกจำกัดแมนนิทอล (สารอินทรีย์) โดยกำหนดให้ 1 ยูนิทเท่ากับ 0.8 ไมโครกรัมน้ำหนักแห้งต่อมิลลิลิตร
ที่มา : Monod (1949)

ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรด จะต้องเริ่มต้นตั้งแต่ทำการเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารแข็ง selective medium โดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน จากนั้นจึงทำการถ่ายแบคทีเรียลงในอาหารสำหรับการผลิตกรด shaker culture medium ที่มีปริมาณสารอาหารที่ลดลง ได้แก่ yeast extract จาก 5.0 เหลือ 1.0 กรัมต่อลิตร โปแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตจาก 1.0 เหลือ 0.5 กรัมต่อลิตร และเพิ่มแอมโมเนียมคลอไรด์ลงในสูตรอาหารปริมาณ 3 กรัมต่อลิตร ดังนั้นในอาหารเหลวสูตร shaker culture medium จึงมีปริมาณสารลดลง ทำให้แบคทีเรียหยุดการเจริญเติบโตเมื่อใช้สารอาหารในระบบหมด ส่งผลให้ความสามารถในการผลิตกรดมาลิกลดน้อยลง แต่จากเหตุผลที่กล่าวมายังไม่ชัดเจนมากพอ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นอญูตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในสาเหตุอื่นๆ Bull (2013) ได้อธิบายว่าในแบคทีเรียจะมีอยู่ยีนหนึ่งที่เป็นยีน “เห็นแก่ตัว” เมื่อแบคทีเรียพบว่าในสภาพแวดล้อมที่อาศัยอยู่อาหารกำลังหมด แบคทีเรียจะปกป้องตนเองโดยปิดยีนนี้ ส่งผลให้อัตราเมตาบอลิซึมและการสืบพันธุ์ลดต่ำลง อย่างไรก็ตามเมื่อยีนนี้เปิดการทำงาน แบคทีเรียจะกินอาหารที่เหลือทั้งหมดรวมทั้งแบคทีเรียที่ตายแล้วอื่นๆด้วย เป็นที่น่าสนใจว่าในธรรมชาติยีนนี้จะถูกปิดไว้ แต่เมื่อนำแบคทีเรียมาเลี้ยงในงานเพาะเชื้อและตัดแหล่งอาหารที่ต้องการออก และยีนนี้จะทำงานในเฉพาะสถานการณ์นั้นๆ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองโดยเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารแข็ง selective medium จะสังเกตได้ว่าแบคทีเรียเจริญเติบโตได้ดี เห็นโคโลนีชัดเจน และมีความสามารถในการผลิตกรดโดยดูจากการสร้างโซนใสบนอาหาร หลังจากนั้นทำการถ่ายแบคทีเรียลงในอาหารสำหรับการผลิตกรด shaker culture medium ที่มีปริมาณแหล่งไนโตรเจนและโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตลดลง ปริมาณกรดมาลิกที่ไอโซเลต AG2 และ DG2 ผลิตได้มีค่าลดลงอย่างมาก แต่ทั้งสองไอโซเลตยังมีการเจริญเติบโตได้ดีโดยดูที่ปริมาณน้ำตาลที่เหลืออยู่ในอาหาร แต่ลวันลดลงอย่างต่อเนื่อง และมีน้ำตาลเหลือในอาหารเพียงแค่เล็กน้อย



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

1. จากการจำแนกชนิดของ AG2 DG1 และ DG2 โดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่งยีน 16s rRNA ด้วยโปรแกรม blast บนฐานข้อมูล NCBI และลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่าไอโซเลต DG1 และ DG2 มีความคล้ายคลึงกับ *Acetobacter qhanensis* ร้อยละ 98 เป็นแกรมลบ รูปร่างเป็นท่อนสั้น ส่วนไอโซเลต AG2 ยังไม่สามารถระบุชนิดของแบคทีเรียได้ เนื่องจากผลของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่งยีน 16s rRNA และลักษณะทางสัณฐานวิทยาไม่สอดคล้องกัน

2. เมื่อศึกษาผลของชนิดของอาหารต่อการผลิตกรดมาลิก พบว่าทั้งไอโซเลต AG2 และ DG2 สามารถผลิตกรดมาลิกได้สูงเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร shaker culture medium โดยได้ปริมาณกรดมาลิกเท่ากับ 62.93 ± 2.74 และ 72.38 ± 1.75 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

3. เมื่อศึกษาผลของปริมาณกลูโคสเริ่มต้นต่อการผลิตกรดมาลิกพบว่า ไอโซเลต AG2 ผลิตกรดมาลิกและผลได้สูงสุด เมื่อใช้กลูโคสเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร ส่วนไอโซเลต DG2 ได้ปริมาณกรดมาลิกและผลได้สูงสุดเมื่อใช้กลูโคสเริ่มต้น 150 กรัมต่อลิตร

4. เมื่อศึกษาผลของปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตเริ่มต้น พบว่าไอโซเลต AG2 ผลิตกรดมาลิกสูงสุดเมื่อใช้แคลเซียมคาร์บอเนตเริ่มต้น 10 กรัมต่อลิตร ส่วนไอโซเลต DG2 ผลิตกรดมาลิกสูงสุดเมื่อใช้แคลเซียมคาร์บอเนตเริ่มต้น 50 กรัมต่อลิตร

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. ควรศึกษาปัจจัยอื่นที่ส่งผลต่อการผลิตกรดมาลิก เช่น

-ชนิดและความเข้มข้นเริ่มต้นของแหล่งไนโตรเจน เนื่องจากมีแหล่งไนโตรเจนหลากหลายชนิดที่ส่งผลต่อปริมาณกรดมาลิกที่แตกต่างกัน

-อุณหภูมิ เนื่องจากแบคทีเรียแต่ละชนิดมีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต และการผลิตสารแตกต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

-ความเร็วรอบในการเขย่า ซึ่งจะส่งผลต่ออัตราการให้อากาศในระหว่างการเพาะเลี้ยง เนื่องจากอากาศมีความสำคัญต่อการผลิตกรดมาลิกผ่านวิถีกรดซิตริก

2. ควบคุมาอัตราการเจริญเติบโต (growth curve) ของแบคทีเรีย เนื่องจากแบคทีเรีย แต่ละชนิดมีอัตราการเจริญเติบโตต่างกัน และสามารถเลือกระยะเวลาที่เหมาะสมมาเตรียมหัวเชื้อ



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

- กรมส่งเสริมอุตสาหกรรม. 2552. พลาสติกชีวภาพ (Bioplastic). [Online]. Available : <http://library.dip.go.th/Industrial%20Innovation/www/innonew0-01.html>. Accessed 25 December 2015
- ธัมมทิวัดต์ นรารัตน์วันชัย. 2555. เครื่องสำอางที่มีส่วนผสมพิเศษ. [Online]. Available : <http://www.mfu.ac.th/school/antiaging/admin/uploadCMS/research/4uWed125505.pdf>. Accessed 26 June 2016
- นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ. 2553. จุลชีววิทยาทั่วไป. พิมพ์ครั้งที่ 9. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- ประนุก ตันไพบูลย์. 2549. “Emergency Treatment of Inborn Error of Metabolism.” วารสารโภชนบำบัด. 17(3) : 116-123.
- ประภัสสร เทพกัมภ์ และ สุพรรณิภา ยอดสง่า. 2557. “การคัดแยกจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตกรดอะดิพิคจากแหล่งธรรมชาติ.” โครงการพิเศษระดับวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- ปิยะนุช เนียมทรัพย์. 2540. “เชื้อราเอนโดไฟต์ที่สามารถผลิตกรดมาลิกและกรดทาร์ทาริก.” วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- พรพิมล ม่วงไทย. 2553. “เคมีของการเกิดสีน้ำตาลโดยปฏิกิริยาเมลลาร์ด.” วารสารมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ (สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี). 2(4) : 1-9.
- สุภัตรา โพธิ์เอี่ยม และอนุรักษ โพธิ์เอี่ยม. 2557. ปฏิบัติการพันธุวิศวกรรม. กรุงเทพฯ: ห้างหุ้นส่วนจำกัด มิน เซอร์วิส ซัพพลาย
- Battat, E. Peleg, Y. Bercovitz, A. J. Rokem, JS. Goldberg, I. 1990. “Optimization of l-malic acid production by *Aspergillus flavus* in a stirred fermentor.” *Biotechnology and Bioengineering*. 37(11) : 1108-1116.
- Brown, S. H. Bashkirova, L. Berka, R. Chandler, T. Doty, T. McCall, K. McCulloch, M. McFarland, S. Thompson, S. Yaver, D. Berry, A. 2013. “Metabolic engineering of *Aspergillus oryzae* NRRL 3488 for increased production of l-malic acid.” *Applied Microbiology Biotechnology*. 97 : 8903-8912.
- Bull, S. 2013. *Olduvai* . 1 st ed. Canada : FriesenPress
- Curcio, E. Profio, G. D. Drioli, E. 2002. “Recovery of fumaric acid by membrane crystallization in the production of l-malic acid.” *Separation and Purification Technology*. 33 : 63-73.
- Elias, E. J. M. Upton, A. M. Cherianand, J. McKinney, J. D. 2006. “Role of the methylcitrate cycle in *Mycobacterium tuberculosis* metabolism, intracellular growth, and virulence.” *Molecular Microbiology*. 60(5) : 1109-1112.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง(ต่อ)

- Giorno, L. Drioli, E. Carvoli, G. Cassano, A. Donato, L. 2000. "Study of an enzyme membrane reactor with immobilized fumarase for production of l-malic acid." *Biotechnology and Bioengineering*. 72(1) : 77-84.
- Hronská, H. Tokošová, S. Pilniková, A. Křištofiková, L. Rosenberg, M. 2014. "Bioconversion of fumaric acid to l-malic acid by the bacteria of the genus *Nocardia*." *Applied Biochemical Biotechnology*. 175 : 266-273.
- Janda, J. M. Abbott, S. L. 2007. "16s rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluse, perils, and pitfalls." *Journal of Clinical Microbiology*. 45(9) : 2761-2764.
- 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.
- Kosugi, S. Kiyoshi, K. Oba, T. Kusumoto, K. Kadokura, T. Nakazato, A. Nakayama, S. 2013. "Isolation of a high malic and low acetic acid-producing sake yeast *Saccharomyces cerevisiae* strain screened from respiratory inhibitor 2,4-dinitrophenol (DNP)-resistant strains." *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 117(1) : 39-44.
- Krull, R. Freyer, A. Minard, R. 1991. "An NMR study of the stereochemistry of the fumarase catalyzed hydration of fumaric acid." *Chemical Edition*. 68 : 436-437.
- Liu, S. J. Steinbuchel, A. 1997. "Production of poly (malic acid) from different carbon sources and its regulation in *Aureobasidium pullulans*." *Biotechnology Letters*. 19(1) : 11-14.
- Ma, Y. Wang, G. Y. Liu, G. L. Wang, Z. P. Chi, Z. M. 2013. "Overproduction of poly (β -l-malic acid) (PMA) from glucose by a novel *Aureobasidium* sp. P6 strain isolated from mangrove system." *Applied Microbiology Biotechnology*. 97 : 8931-8939.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง(ต่อ)

- Michal, G. and Schomburg, D. 2012. *Biochemical Pathways An Atlas of Biochemistry and Molecular Biology*. 2nd ed. New Jersey: John Wiley and Sons.
- Monod; J. 1949. "The growth of bacteria cultures." *Annual Reviews Microbial*. 3 : 371-394.
- Mondala, A. H. 2015. "Direct fungal fermentation of lignocellulosic biomass into itaconic, fumaric, and malic acids : Current and Future Prospects." *Journal Industry Microbiology Biotechnology*. 42 : 487-506.
- Neufeld, R.J. Peleg, Y. Rokem, J.S. Pines, O. Goldber, I. 1991. "L-malic acid formation by immobilized *Saccharomyces cerevisiae* amplified for fumarase." *Enzyme and Microbial Technology*. 13(12) : 991-996.
- Skoog, A. Douglas. Holler, F. James. Crouch, R. Stanley. 2007. *Principles of instrumental analysis*. Thomson Higher Education: Belmont.
- Spitaels, F. Li, L. Wieme, A. Balzarini, T. Cleenwerck, I. Landschoot, A. V. Vuyst, L. D. Vandamme, P. 2014. "*Acetobacter lambici* sp. nov., isolated from fermenting lambic beer." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 64 : 1083-1089.
- Takata, I. Yamamoto, K. Tosa, T. Chibata, I. 1980. "Immobilization of *Brevibacterium flavum* with carrageenan and its application for continuous production of L-malic acid." *Enzyme and Microbial Technology*. 2(1) : 30-36.
- Takeuchi, M. Weiss, N. Schumann, P. Yokota, A. 1996. "*Leucobacter komagatae* gen. nov., sp. nov., a new aerobic gram-positive, nonsporulating rod with 2,4-diarninobutyric acid in the cell wall." *International Journal of Systematic Bacteriology*. 46(4) : 967-971.
- Vongsangnak, W. Hansen, K. Nielson, J. 2011. "Integrated analysis of the global transcriptional response to α -amylase over-production by *Aspergillus oryzae*." *Biotechnology and Bioengineering*. 108 : 1130-1139.

เอกสารอ้างอิง(ต่อ)

- Yamamoto, K. Tosa, T. Tarnashito, K. Chibata, I. 1976. "Continuous production of l-malic acid by immobilized *Brevibacterium ammoniagenes* cells." *Biotechnologie European journal of applied microbiology and biotechnology*. 3(3) : 169-188.
- Yarza, P. Yilmaz, P. Pruesse, E. Glockner, F.O. Ludwig, W. Schleifer, K.H. Whitman, W.B. Euzeby, J. Amann, R and Rosselló-Móra, R. 2014. "Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences." *Nature Reviews Microbiology*. 12 : 635-645.
- Zambanini, T. Sarikaya, E. Kleineberg, W. Buescher, J.M. Meurer, G. Wierckx, N. Blank, L.M. 2016. "Efficient malic acid production from glycerol with *Ustilago trichophora* TZ1." *Biotechnology for Biofuels*. 67(9) : 1-8.
- Zhang, S. Cai, J. Dong, J. Zhang, D. Huang, L. Xu, Z. Cen, P. 2011. "High-level Production of Poly (β -L-malic acid) with a New Isolated *Aureobasidium pullulans* strain." *Applied Microbiology Biotechnology*. 92 : 295-303.
- Zou, X. Wang, Y. Tu, G. Zan, Z. Wu, X. 2015. "Adaptation and transcriptome analysis of *Aureobasidium pullulans* in corncob hydrolysate for increased Inhibitor tolerance to malic acid production." *Plos One*. 10(3) : 1-17.
- Zoua, X. Yanga, J. Tiana, X. Guoc, M. Lid, Z. Li, Y. 2015. "Production of polymalic acid and malic acid from xylose and corncob hydrolysate by a novel *Aureobasidium pullulans* YJ 6-11 strain." *Process Biochemistry*. 51(1) : 16-23.



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 | กรัมต่อลิตร |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 0.5 | กรัมต่อลิตร |
| CaCO_3 | 10 | กรัมต่อลิตร |
| Agar | 20 | กรัมต่อลิตร |

2. สูตรอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อตรวจสอบการผลิตกรด

2.1 สูตรอาหาร Shaker culture medium (Tabushi และคณะ, 1981)

| | | |
|---|------|-------------|
| Glucose | 100 | กรัมต่อลิตร |
| NH_4Cl | 0.3 | กรัมต่อลิตร |
| KH_2PO_4 | 0.05 | กรัมต่อลิตร |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 0.05 | กรัมต่อลิตร |
| Yeast extract | 0.1 | กรัมต่อลิตร |
| CaCO_3 | 30 | กรัมต่อลิตร |

ภาคผนวก ข

วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลเมื่อใช้ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 100 150 200 และ 250 กรัมต่อลิตร

1. วิธีเตรียมสารละลายกลูโคสมาตรฐาน

ทำการอบกลูโคสที่ปราศจากน้ำในตู้อบอุณหภูมิ 60 ถึง 70 องศาเซลเซียส จากนั้นทิ้งให้เย็นในเดซิเคเตอร์เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นชั่งน้ำหนักกลูโคสที่เตรียมได้ 0.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลายกลูโคสมาตรฐานความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นทำการเจือจางสารละลายกลูโคสมาตรฐานที่ได้โดยใช้น้ำกลั่น ดังตารางที่ ข1

ตารางที่ ข1 ตารางการเจือจางสารละลายกลูโคสมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ

| ความเข้มข้นกลูโคสมาตรฐาน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) | สารละลายกลูโคสมาตรฐาน (มิลลิลิตร) | น้ำกลั่น (มิลลิลิตร) |
|---|--------------------------------------|-------------------------|
| 0 | 0 | 5 |
| 200 | 1 | 4 |
| 400 | 2 | 3 |
| 600 | 3 | 2 |
| 800 | 4 | 1 |
| 1000 | 5 | 0 |

จากนั้นทำการเตรียมกราฟมาตรฐานกลูโคส โดยนำสารละลายกลูโคสที่ความเข้มข้นต่างๆที่เตรียมไว้ และทำการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธีดีเอ็นเอส โดยใช้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

2. วิธีเตรียมสารละลายดีเอ็นเอสความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร

ชั่งสาร 3,5-ไดไนโตรซาลิไซลิก 10 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 250 มิลลิลิตร เติมสารละลายต่างที่ละน้อย (โซเดียมไฮดรอกไซด์ 2 โมลาร์ : ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 16 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร) จากนั้นคนสารละลายทั้งสองให้เข้ากัน จากนั้นทำการเติมโพแทสเซียมทาทาลอยไปทีละน้อยพร้อมกับคนให้เข้ากันจนครบ 300 กรัม และปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 1000 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น เก็บสารละลายที่เตรียมได้และกรองผ่านกระดาษกรองแล้วไว้ในขวดสีชา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข2 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลืออยู่ของไอโซเลต AG2 เมื่อใช้กลูโคสเริ่มต้น 100 และ 150 กรัมต่อลิตร และแคลเซียมคาร์บอเนต 30 กรัม

| | | 10 | 1.773 | 1.793 | 1.866 | 1.914 | 1.973 ± 0.03 | 1.991 ± 0.03 | 2.011 ± 0.03 | 2.032 ± 0.03 | 2.053 ± 0.03 | 2.074 ± 0.03 | 2.095 ± 0.03 | 2.116 ± 0.03 | 2.137 ± 0.03 | 2.158 ± 0.03 | 2.179 ± 0.03 | 2.200 ± 0.03 | 2.221 ± 0.03 | 2.242 ± 0.03 | 2.263 ± 0.03 | 2.284 ± 0.03 | 2.305 ± 0.03 | 2.326 ± 0.03 | 2.347 ± 0.03 | 2.368 ± 0.03 | 2.389 ± 0.03 | 2.410 ± 0.03 | 2.431 ± 0.03 | 2.452 ± 0.03 | 2.473 ± 0.03 | 2.494 ± 0.03 | 2.515 ± 0.03 | 2.536 ± 0.03 | 2.557 ± 0.03 | 2.578 ± 0.03 | 2.599 ± 0.03 | 2.620 ± 0.03 | 2.641 ± 0.03 | 2.662 ± 0.03 | 2.683 ± 0.03 | 2.704 ± 0.03 | 2.725 ± 0.03 | 2.746 ± 0.03 | 2.767 ± 0.03 | 2.788 ± 0.03 | 2.809 ± 0.03 | 2.830 ± 0.03 | 2.851 ± 0.03 | 2.872 ± 0.03 | 2.893 ± 0.03 | 2.914 ± 0.03 | 2.935 ± 0.03 | 2.956 ± 0.03 | 2.977 ± 0.03 | 2.998 ± 0.03 | 3.019 ± 0.03 | 3.040 ± 0.03 | 3.061 ± 0.03 | 3.082 ± 0.03 | 3.103 ± 0.03 | 3.124 ± 0.03 | 3.145 ± 0.03 | 3.166 ± 0.03 | 3.187 ± 0.03 | 3.208 ± 0.03 | 3.229 ± 0.03 | 3.250 ± 0.03 | 3.271 ± 0.03 | 3.292 ± 0.03 | 3.313 ± 0.03 | 3.334 ± 0.03 | 3.355 ± 0.03 | 3.376 ± 0.03 | 3.397 ± 0.03 | 3.418 ± 0.03 | 3.439 ± 0.03 | 3.460 ± 0.03 | 3.481 ± 0.03 | 3.502 ± 0.03 | 3.523 ± 0.03 | 3.544 ± 0.03 | 3.565 ± 0.03 | 3.586 ± 0.03 | 3.607 ± 0.03 | 3.628 ± 0.03 | 3.649 ± 0.03 | 3.670 ± 0.03 | 3.691 ± 0.03 | 3.712 ± 0.03 | 3.733 ± 0.03 | 3.754 ± 0.03 | 3.775 ± 0.03 | 3.796 ± 0.03 | 3.817 ± 0.03 | 3.838 ± 0.03 | 3.859 ± 0.03 | 3.880 ± 0.03 | 3.901 ± 0.03 | 3.922 ± 0.03 | 3.943 ± 0.03 | 3.964 ± 0.03 | 3.985 ± 0.03 | 4.006 ± 0.03 | 4.027 ± 0.03 | 4.048 ± 0.03 | 4.069 ± 0.03 | 4.090 ± 0.03 | 4.111 ± 0.03 | 4.132 ± 0.03 | 4.153 ± 0.03 | 4.174 ± 0.03 | 4.195 ± 0.03 | 4.216 ± 0.03 | 4.237 ± 0.03 | 4.258 ± 0.03 | 4.279 ± 0.03 | 4.300 ± 0.03 | 4.321 ± 0.03 | 4.342 ± 0.03 | 4.363 ± 0.03 | 4.384 ± 0.03 | 4.405 ± 0.03 | 4.426 ± 0.03 | 4.447 ± 0.03 | 4.468 ± 0.03 | 4.489 ± 0.03 | 4.510 ± 0.03 | 4.531 ± 0.03 | 4.552 ± 0.03 | 4.573 ± 0.03 | 4.594 ± 0.03 | 4.615 ± 0.03 | 4.636 ± 0.03 | 4.657 ± 0.03 | 4.678 ± 0.03 | 4.699 ± 0.03 | 4.720 ± 0.03 | 4.741 ± 0.03 | 4.762 ± 0.03 | 4.783 ± 0.03 | 4.804 ± 0.03 | 4.825 ± 0.03 | 4.846 ± 0.03 | 4.867 ± 0.03 | 4.888 ± 0.03 | 4.909 ± 0.03 | 4.930 ± 0.03 | 4.951 ± 0.03 | 4.972 ± 0.03 | 4.993 ± 0.03 | 5.014 ± 0.03 | 5.035 ± 0.03 | 5.056 ± 0.03 | 5.077 ± 0.03 | 5.098 ± 0.03 | 5.119 ± 0.03 | 5.140 ± 0.03 | 5.161 ± 0.03 | 5.182 ± 0.03 | 5.203 ± 0.03 | 5.224 ± 0.03 | 5.245 ± 0.03 | 5.266 ± 0.03 | 5.287 ± 0.03 | 5.308 ± 0.03 | 5.329 ± 0.03 | 5.350 ± 0.03 | 5.371 ± 0.03 | 5.392 ± 0.03 | 5.413 ± 0.03 | 5.434 ± 0.03 | 5.455 ± 0.03 | 5.476 ± 0.03 | 5.497 ± 0.03 | 5.518 ± 0.03 | 5.539 ± 0.03 | 5.560 ± 0.03 | 5.581 ± 0.03 | 5.602 ± 0.03 | 5.623 ± 0.03 | 5.644 ± 0.03 | 5.665 ± 0.03 | 5.686 ± 0.03 | 5.707 ± 0.03 | 5.728 ± 0.03 | 5.749 ± 0.03 | 5.770 ± 0.03 | 5.791 ± 0.03 | 5.812 ± 0.03 | 5.833 ± 0.03 | 5.854 ± 0.03 | 5.875 ± 0.03 | 5.896 ± 0.03 | 5.917 ± 0.03 | 5.938 ± 0.03 | 5.959 ± 0.03 | 5.980 ± 0.03 | 6.001 ± 0.03 | 6.022 ± 0.03 | 6.043 ± 0.03 | 6.064 ± 0.03 | 6.085 ± 0.03 | 6.106 ± 0.03 | 6.127 ± 0.03 | 6.148 ± 0.03 | 6.169 ± 0.03 | 6.190 ± 0.03 | 6.211 ± 0.03 | 6.232 ± 0.03 | 6.253 ± 0.03 | 6.274 ± 0.03 | 6.295 ± 0.03 | 6.316 ± 0.03 | 6.337 ± 0.03 | 6.358 ± 0.03 | 6.379 ± 0.03 | 6.400 ± 0.03 | 6.421 ± 0.03 | 6.442 ± 0.03 | 6.463 ± 0.03 | 6.484 ± 0.03 | 6.505 ± 0.03 | 6.526 ± 0.03 | 6.547 ± 0.03 | 6.568 ± 0.03 | 6.589 ± 0.03 | 6.610 ± 0.03 | 6.631 ± 0.03 | 6.652 ± 0.03 | 6.673 ± 0.03 | 6.694 ± 0.03 | 6.715 ± 0.03 | 6.736 ± 0.03 | 6.757 ± 0.03 | 6.778 ± 0.03 | 6.799 ± 0.03 | 6.820 ± 0.03 | 6.841 ± 0.03 | 6.862 ± 0.03 | 6.883 ± 0.03 | 6.904 ± 0.03 | 6.925 ± 0.03 | 6.946 ± 0.03 | 6.967 ± 0.03 | 6.988 ± 0.03 | 7.009 ± 0.03 | 7.030 ± 0.03 | 7.051 ± 0.03 | 7.072 ± 0.03 | 7.093 ± 0.03 | 7.114 ± 0.03 | 7.135 ± 0.03 | 7.156 ± 0.03 | 7.177 ± 0.03 | 7.198 ± 0.03 | 7.219 ± 0.03 | 7.240 ± 0.03 | 7.261 ± 0.03 | 7.282 ± 0.03 | 7.303 ± 0.03 | 7.324 ± 0.03 | 7.345 ± 0.03 | 7.366 ± 0.03 | 7.387 ± 0.03 | 7.408 ± 0.03 | 7.429 ± 0.03 | 7.450 ± 0.03 | 7.471 ± 0.03 | 7.492 ± 0.03 | 7.513 ± 0.03 | 7.534 ± 0.03 | 7.555 ± 0.03 | 7.576 ± 0.03 | 7.597 ± 0.03 | 7.618 ± 0.03 | 7.639 ± 0.03 | 7.660 ± 0.03 | 7.681 ± 0.03 | 7.702 ± 0.03 | 7.723 ± 0.03 | 7.744 ± 0.03 | 7.765 ± 0.03 | 7.786 ± 0.03 | 7.807 ± 0.03 | 7.828 ± 0.03 | 7.849 ± 0.03 | 7.870 ± 0.03 | 7.891 ± 0.03 | 7.912 ± 0.03 | 7.933 ± 0.03 | 7.954 ± 0.03 | 7.975 ± 0.03 | 7.996 ± 0.03 | 8.017 ± 0.03 | 8.038 ± 0.03 | 8.059 ± 0.03 | 8.080 ± 0.03 | 8.101 ± 0.03 | 8.122 ± 0.03 | 8.143 ± 0.03 | 8.164 ± 0.03 | 8.185 ± 0.03 | 8.206 ± 0.03 | 8.227 ± 0.03 | 8.248 ± 0.03 | 8.269 ± 0.03 | 8.290 ± 0.03 | 8.311 ± 0.03 | 8.332 ± 0.03 | 8.353 ± 0.03 | 8.374 ± 0.03 | 8.395 ± 0.03 | 8.416 ± 0.03 | 8.437 ± 0.03 | 8.458 ± 0.03 | 8.479 ± 0.03 | 8.500 ± 0.03 | 8.521 ± 0.03 | 8.542 ± 0.03 | 8.563 ± 0.03 | 8.584 ± 0.03 | 8.605 ± 0.03 | 8.626 ± 0.03 | 8.647 ± 0.03 | 8.668 ± 0.03 | 8.689 ± 0.03 | 8.710 ± 0.03 | 8.731 ± 0.03 | 8.752 ± 0.03 | 8.773 ± 0.03 | 8.794 ± 0.03 | 8.815 ± 0.03 | 8.836 ± 0.03 | 8.857 ± 0.03 | 8.878 ± 0.03 | 8.899 ± 0.03 | 8.920 ± 0.03 | 8.941 ± 0.03 | 8.962 ± 0.03 | 8.983 ± 0.03 | 9.004 ± 0.03 | 9.025 ± 0.03 | 9.046 ± 0.03 | 9.067 ± 0.03 | 9.088 ± 0.03 | 9.109 ± 0.03 | 9.130 ± 0.03 | 9.151 ± 0.03 | 9.172 ± 0.03 | 9.193 ± 0.03 | 9.214 ± 0.03 | 9.235 ± 0.03 | 9.256 ± 0.03 | 9.277 ± 0.03 | 9.298 ± 0.03 | 9.319 ± 0.03 | 9.340 ± 0.03 | 9.361 ± 0.03 | 9.382 ± 0.03 | 9.403 ± 0.03 | 9.424 ± 0.03 | 9.445 ± 0.03 | 9.466 ± 0.03 | 9.487 ± 0.03 | 9.508 ± 0.03 | 9.529 ± 0.03 | 9.550 ± 0.03 | 9.571 ± 0.03 | 9.592 ± 0.03 | 9.613 ± 0.03 | 9.634 ± 0.03 | 9.655 ± 0.03 | 9.676 ± 0.03 | 9.697 ± 0.03 | 9.718 ± 0.03 | 9.739 ± 0.03 | 9.760 ± 0.03 | 9.781 ± 0.03 | 9.802 ± 0.03 | 9.823 ± 0.03 | 9.844 ± 0.03 | 9.865 ± 0.03 | 9.886 ± 0.03 | 9.907 ± 0.03 | 9.928 ± 0.03 | 9.949 ± 0.03 | 9.970 ± 0.03 | 9.991 ± 0.03 | 10.012 ± 0.03 | 10.033 ± 0.03 | 10.054 ± 0.03 | 10.075 ± 0.03 | 10.096 ± 0.03 | 10.117 ± 0.03 | 10.138 ± 0.03 | 10.159 ± 0.03 | 10.180 ± 0.03 | 10.201 ± 0.03 | 10.222 ± 0.03 | 10.243 ± 0.03 | 10.264 ± 0.03 | 10.285 ± 0.03 | 10.306 ± 0.03 | 10.327 ± 0.03 | 10.348 ± 0.03 | 10.369 ± 0.03 | 10.390 ± 0.03 | 10.411 ± 0.03 | 10.432 ± 0.03 | 10.453 ± 0.03 | 10.474 ± 0.03 | 10.495 ± 0.03 | 10.516 ± 0.03 | 10.537 ± 0.03 | 10.558 ± 0.03 | 10.579 ± 0.03 | 10.600 ± 0.03 | 10.621 ± 0.03 | 10.642 ± 0.03 | 10.663 ± 0.03 | 10.684 ± 0.03 | 10.705 ± 0.03 | 10.726 ± 0.03 | 10.747 ± 0.03 | 10.768 ± 0.03 | 10.789 ± 0.03 | 10.810 ± 0.03 | 10.831 ± 0.03 | 10.852 ± 0.03 | 10.873 ± 0.03 | 10.894 ± 0.03 | 10.915 ± 0.03 | 10.936 ± 0.03 | 10.957 ± 0.03 | 10.978 ± 0.03 | 10.999 ± 0.03 | 11.020 ± 0.03 | 11.041 ± 0.03 | 11.062 ± 0.03 | 11.083 ± 0.03 | 11.104 ± 0.03 | 11.125 ± 0.03 | 11.146 ± 0.03 | 11.167 ± 0.03 | 11.188 ± 0.03 | 11.209 ± 0.03 | 11.230 ± 0.03 | 11.251 ± 0.03 | 11.272 ± 0.03 | 11.293 ± 0.03 | 11.314 ± 0.03 | 11.335 ± 0.03 | 11.356 ± 0.03 | 11.377 ± 0.03 | 11.398 ± 0.03 | 11.419 ± 0.03 | 11.440 ± 0.03 | 11.461 ± 0.03 | 11.482 ± 0.03 | 11.503 ± 0.03 | 11.524 ± 0.03 | 11.545 ± 0.03 | 11.566 ± 0.03 | 11.587 ± 0.03 | 11.608 ± 0.03 | 11.629 ± 0.03 | 11.650 ± 0.03 | 11.671 ± 0.03 | 11.692 ± 0.03 | 11.713 ± 0.03 | 11.734 ± 0.03 | 11.755 ± 0.03 | 11.776 ± 0.03 | 11.797 ± 0.03 | 11.818 ± 0.03 | 11.839 ± 0.03 | 11.860 ± 0.03 | 11.881 ± 0.03 | 11.902 ± 0.03 | 11.923 ± 0.03 | 11.944 ± 0.03 | 11.965 ± 0.03 | 11.986 ± 0.03 | 12.007 ± 0.03 | 12.028 ± 0.03 | 12.049 ± 0.03 | 12.070 ± 0.03 | 12.091 ± 0.03 | 12.112 ± 0.03 | 12.133 ± 0.03 | 12.154 ± 0.03 | 12.175 ± 0.03 | 12.196 ± 0.03 | 12.217 ± 0.03 | 12.238 ± 0.03 | 12.259 ± 0.03 | 12.280 ± 0.03 | 12.301 ± 0.03 | 12.322 ± 0.03 | 12.343 ± 0.03 | 12.364 ± 0.03 | 12.385 ± 0.03 | 12.406 ± 0.03 | 12.427 ± 0.03 | 12.448 ± 0.03 | 12.469 ± 0.03 | 12.490 ± 0.03 | 12.511 ± 0.03 | 12.532 ± 0.03 | 12.553 ± 0.03 | 12.574 ± 0.03 | 12.595 ± 0.03 | 12.616 ± 0.03 | 12.637 ± 0.03 | 12.658 ± 0.03 | 12.679 ± 0.03 | 12.700 ± 0.03 | 12.721 ± 0.03 | 12.742 ± 0.03 | 12.763 ± 0.03 | 12.784 ± 0.03 | 12.805 ± 0.03 | 12.826 ± 0.03 | 12.847 ± 0.03 | 12.868 ± 0.03 | 12.889 ± 0.03 | 12.910 ± 0.03 | 12.931 ± 0.03 | 12.952 ± 0.03 | 12.973 ± 0.03 | 12.994 ± 0.03 | 13.015 ± 0.03 | 13.036 ± 0.03 | 13.057 ± 0.03 | 13.078 ± 0.03 | 13.099 ± 0.03 | 13.120 ± 0.03 | 13.141 ± 0.03 | 13.162 ± 0.03 | 13.183 ± 0.03 | 13.204 ± 0.03 | 13.225 ± 0.03 | 13.246 ± 0.03 | 13.267 ± 0.03 | 13.288 ± 0.03 | 13.309 ± 0.03 | 13.330 ± 0.03 | 13.351 ± 0.03 | 13.372 ± 0.03 | 13.393 ± 0.03 | 13.414 ± 0.03 | 13.435 ± 0.03 | 13.456 ± 0.03 | 13.477 ± 0.03 | 13.498 ± 0.03 | 13.519 ± 0.03 | 13.540 ± 0.03 | 13.561 ± 0.03 | 13.582 ± 0.03 | 13.603 ± 0.03 | 13.624 ± 0.03 | 13.645 ± 0.03 | 13.666 ± 0.03 | 13.687 ± 0.03 | 13.708 ± 0.03 | 13.729 ± 0.03 | 13.750 ± 0.03 | 13.771 ± 0.03 | 13.792 ± 0.03 | 13.813 ± 0.03 | 13.834 ± 0.03 | 13.855 ± 0.03 | 13.876 ± 0.03 | 13.897 ± 0.03 | 13.918 ± 0.03 | 13.939 ± 0.03 | 13.960 ± 0.03 | 13.981 ± 0.03 | 14.002 ± 0.03 | 14.023 ± 0.03 | 14.044 ± 0.03 | 14.065 ± 0.03 | 14.086 ± 0.03 | 14.107 ± 0.03 | 14.128 ± 0.03 | 14.149 ± 0.03 | 14.170 ± 0.03 | 14.191 ± 0.03 | 14.212 ± 0.03 | 14.233 ± 0.03 | 14.254 ± 0.03 | 14.275 ± 0.03 | 14.296 ± 0.03 | 14.317 ± 0.03 | 14.338 ± 0.03 | 14.359 ± 0.03 | 14.380 ± 0.03 | 14.401 ± 0.03 | 14.422 ± 0.03 | 14.443 ± 0.03 | 14.464 ± 0.03 | 14.485 ± 0.03 | 14.506 ± 0.03 | 14.527 ± 0.03 | 14.548 ± 0.03 | 14.569 ± 0.03 | 14.590 ± 0.03 | 14.611 ± 0.03 | 14.632 ± 0.03 | 14.653 ± 0.03 | 14.674 ± 0.03 | 14.695 ± 0.03 | 14.716 ± 0.03 | 14.737 ± 0.03 | 14.758 ± 0.03 | 14.779 ± 0.03 | 14.800 ± 0.03 | 14.821 ± 0.03 | 14.842 ± 0.03 | 14.863 ± 0.03 | 14.884 ± 0.03 | 14.905 ± 0.03 | 14.926 ± 0.03 | 14.947 ± 0.03 | 14.968 ± 0.03 | 14.989 ± 0.03 | 15.010 ± 0.03 | 15.031 ± 0.03 | 15.052 ± 0.03 | 15.073 ± 0.03 | 15.094 ± 0.03 | 15.115 ± 0.03 | 15.136 ± 0.03 | 15.157 ± 0.03 | 15.178 ± 0.03 | 15.199 ± 0.03 | 15.220 ± 0.03 | 15.241 ± 0.03 | 15.262 ± 0.03 | 15.283 ± 0.03 | 15.304 ± 0.03 | 15.325 ± 0.03 | 15.346 ± 0.03 | 15.367 ± 0.03 | 15.388 ± 0.03 | 15.409 ± 0.03 | 15.430 ± 0.03 | 15.451 ± 0.03 | 15.472 ± 0.03 | 15.493 ± 0.03 | 15.514 ± 0.03 | 15.535 ± 0.03 | 15.556 ± 0.03 | 15.577 ± 0.03 | 15.598 ± 0.03 | 15.619 ± 0.03 | 15.640 ± 0.03 | 15.661 ± 0.03 | 15.682 ± 0.03 | 15.703 ± 0.03 | 15.724 ± 0.03 | 15.745 ± 0.03 | 15.766 ± 0.03 | 15.787 ± 0.03 | 15.808 ± 0.03 | 15.829 ± 0.03 | 15.850 ± 0.03 | 15.871 ± 0.03 | 15.892 ± 0.03 | 15.913 ± 0.03 | 15.934 ± 0.03 | 15.955 ± 0.03 | 15.976 ± 0.03 | 15.997 ± 0.03 | 16.018 ± 0.03 | 16.039 ± 0.03 | 16.060 ± 0.03 | 16.081 ± 0.03 | 16.102 ± 0.03 | 16.123 ± 0.03 | 16.144 ± 0.03 | 16.165 ± 0.03 | 16.186 ± 0.03 | 16.207 ± 0.03 | 16.228 ± 0.03 | 16.249 ± 0.03 | 16.270 ± 0.03 | 16.291 ± 0.03 | 16.312 ± 0.03 | 16.333 ± 0.03 | 16.354 ± 0.03 | 16.375 ± 0.03 | 16.396 ± 0.03 | 16.417 ± 0.03 | 16.438 ± 0.03 | 16.459 ± 0.03 | 16.480 ± 0.03 | 16.501 ± 0.03 | 16.522 ± 0.03 | 16.543 ± 0.03 | 16.564 ± 0.03 | 16.585 ± 0.03 | 16.606 ± 0.03 | 16.627 ± |
|--|--|----|-------|-------|-------|-------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|----------|
|--|--|----|-------|-------|-------|-------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|----------|

ตารางที่ ข2(ต่อ) ปริมาณน้ำตาลรีตีวซ์ที่เหลืออยู่ของไอโซเลต AG2 เมื่อใช้กลูโคสเริ่มต้น 200 และ 250 กรัมต่อลิตร และแคลเซียมคาร์บอเนต 30 กรัม

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|----|--------------|-------|-------|-------|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|--------|--------------|---------------|--------|-------|-------|--------------|--------------|------|------|-----------|-------------|--------------|------|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|
| 1 | 10 | 2.301 | 2.334 | 2.301 | 2.312 | 28762.50 | 29175.00 | 28762.50 | 28900.00 | 28900.00 | 28.90 | 0.17 | 28.90 ± 0.17 | 171.10 | 0.95 | 15.10 | 0.09 | 15.10 ± 0.09 | 0.11 | 1.90 | 5.92 | 0.03 | 5.92 ± 0.03 | 0.63 | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 20 | 1.597 | 1.567 | 1.608 | 1.621 | 39925.00 | 39175.00 | 40200.00 | 40525.00 | 39956.25 | 39.96 | 0.50 | 39.96 ± 0.50 | 160.04 | 0.89 | 15.10 | 0.19 | 15.10 ± 0.19 | 0.11 | 1.78 | 6.33 | 0.08 | 6.33 ± 0.08 | 0.63 | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 50 | 0.583 | 0.578 | 0.558 | 0.564 | 36437.50 | 36125.00 | 34875.00 | 35250.00 | 35671.88 | 35.67 | 0.63 | 35.67 ± 0.63 | 164.33 | 0.91 | 15.10 | 0.27 | 15.10 ± 0.27 | 0.11 | 1.83 | 6.17 | 0.11 | 6.17 ± 0.11 | 0.63 | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 2 | 10 | 2.301 | 2.232 | 2.232 | 2.214 | 28762.50 | 27900.00 | 27900.00 | 27675.00 | 28059.38 | 28.06 | 0.42 | 28.06 ± 0.42 | 171.94 | 0.96 | 18.53 | 0.27 | 18.53 ± 0.27 | 0.14 | 1.91 | 7.23 | 0.11 | 7.23 ± 0.11 | 0.39 | | | | | | | | | | | | | | |
| | | 20 | 1.327 | 1.377 | 1.332 | 1.339 | 33175.00 | 34425.00 | 33300.00 | 33475.00 | 33593.75 | 33.59 | 0.49 | 33.59 ± 0.49 | 166.41 | 0.92 | 18.53 | 0.27 | 18.53 ± 0.27 | 0.14 | 1.85 | 7.48 | 0.11 | 7.48 ± 0.11 | 0.39 | | | | | | | | | | | | | | |
| | | 50 | 0.516 | 0.486 | 0.438 | 0.457 | 32250.00 | 30375.00 | 27375.00 | 28562.50 | 29640.63 | 29.64 | 1.85 | 29.64 ± 1.85 | 170.36 | 0.95 | 18.53 | 1.15 | 18.53 ± 1.15 | 0.14 | 1.89 | 7.30 | 0.45 | 7.30 ± 0.45 | 0.39 | | | | | | | | | | | | | | |
| | 3 | 10 | 1.065 | 1.119 | 1.044 | 1.086 | 13312.50 | 13987.50 | 13050.00 | 13575.00 | 13481.25 | 13.48 | 0.35 | 13.48 ± 0.35 | 186.52 | 1.04 | 71.36 | 1.83 | 71.36 ± 1.83 | 0.53 | 2.07 | 25.68 | 0.66 | 25.68 ± 0.66 | 0.99 | | | | | | | | | | | | | | |
| | | 20 | 0.422 | 0.426 | 0.421 | 0.429 | 10550.00 | 10650.00 | 10525.00 | 10725.00 | 10612.50 | 10.61 | 0.08 | 10.61 ± 0.08 | 189.39 | 1.05 | 71.36 | 0.54 | 71.36 ± 0.54 | 0.53 | 2.10 | 25.29 | 0.19 | 25.29 ± 0.19 | 0.99 | | | | | | | | | | | | | | |
| | | 50 | 0.131 | 0.128 | 0.118 | 0.125 | 8187.50 | 8000.00 | 7375.00 | 7812.50 | 7843.75 | 7.84 | 0.30 | 7.84 ± 0.30 | 192.16 | 1.07 | 71.36 | 2.74 | 71.36 ± 2.74 | 0.53 | 2.14 | 24.93 | 0.96 | 24.93 ± 0.96 | 0.99 | | | | | | | | | | | | | | |
| 250 | 0 | ไม่ได้จัดจาง | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 250000.00 | 250.00 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 1 | 50 | 2.205 | 2.232 | 2.225 | 2.200 | 137812.50 | 139500.00 | 139062.50 | 137500.00 | 138468.75 | 138.47 | 0.83 | 138.47 ± 0.83 | 111.53 | 0.62 | 13.78 | 0.08 | 13.78 ± 0.08 | 0.10 | 1.24 | 8.29 | 0.05 | 8.29 ± 0.05 | 0.57 | | | | | | | | | | | | | | |
| | | 100 | 0.913 | 0.990 | 0.916 | 0.980 | 114125.00 | 123750.00 | 114500.00 | 122500.00 | 118718.75 | 118.72 | 4.43 | 118.72 ± 4.43 | 131.28 | 0.73 | 13.78 | 0.51 | 13.78 ± 0.51 | 0.10 | 1.46 | 7.05 | 0.26 | 7.05 ± 0.26 | 0.57 | | | | | | | | | | | | | | |
| | | 200 | 0.594 | 0.609 | 0.599 | 0.578 | 148500.00 | 152250.00 | 149750.00 | 144500.00 | 148750.00 | 148.75 | 2.80 | 148.75 ± 2.80 | 101.25 | 0.56 | 13.78 | 0.26 | 13.78 ± 0.26 | 0.10 | 1.13 | 9.14 | 0.17 | 9.14 ± 0.17 | 0.57 | | | | | | | | | | | | | | |
| | | 500 | 0.222 | 0.217 | 0.212 | 0.220 | 138750.00 | 135625.00 | 132500.00 | 137500.00 | 136093.75 | 136.09 | 2.35 | 136.09 ± 2.35 | 115.91 | 0.63 | 13.78 | 0.24 | 13.78 ± 0.24 | 0.10 | 1.27 | 8.12 | 0.14 | 8.12 ± 0.14 | 0.57 | | | | | | | | | | | | | | |
| | 2 | 50 | 1.738 | 1.817 | 1.841 | 1.707 | 108625.00 | 113562.50 | 115062.50 | 106687.50 | 110984.38 | 110.98 | 3.44 | 110.98 ± 3.44 | 139.02 | 0.77 | 61.76 | 1.91 | 61.76 ± 1.91 | 0.46 | 1.54 | 29.82 | 0.92 | 29.82 ± 0.92 | 1.29 | | | | | | | | | | | | | | |
| | | 100 | 0.700 | 0.735 | 0.711 | 0.710 | 87500.00 | 91875.00 | 88875.00 | 88750.00 | 89250.00 | 89.25 | 1.61 | 89.25 ± 1.61 | 160.75 | 0.89 | 61.76 | 1.11 | 61.76 ± 1.11 | 0.46 | 1.79 | 25.79 | 0.46 | 25.79 ± 0.46 | 1.29 | | | | | | | | | | | | | | |
| | | 200 | 0.342 | 0.383 | 0.345 | 0.360 | 85500.00 | 95750.00 | 86250.00 | 90000.00 | 89375.00 | 89.38 | 4.06 | 89.38 ± 4.06 | 160.63 | 0.89 | 61.76 | 2.80 | 61.76 ± 2.80 | 0.46 | 1.78 | 25.81 | 1.17 | 25.81 ± 1.17 | 1.29 | | | | | | | | | | | | | | |
| | | 500 | 0.189 | 0.177 | 0.190 | 0.177 | 118125.00 | 110625.00 | 118750.00 | 110625.00 | 114531.25 | 114.53 | 3.91 | 114.53 ± 3.91 | 135.47 | 0.75 | 61.76 | 2.11 | 61.76 ± 2.11 | 0.46 | 1.51 | 30.60 | 1.05 | 30.60 ± 1.05 | 1.29 | | | | | | | | | | | | | | |
| | 3 | 50 | 1.420 | 1.382 | 1.319 | 1.406 | 88750.00 | 86375.00 | 82437.50 | 87875.00 | 86359.38 | 86.36 | 2.42 | 86.36 ± 2.42 | 163.64 | 0.91 | 68.07 | 1.91 | 68.07 ± 1.91 | 0.51 | 1.82 | 27.92 | 0.78 | 27.92 ± 0.78 | 0.95 | | | | | | | | | | | | | | |
| | | 100 | 0.633 | 0.673 | 0.633 | 0.635 | 79125.00 | 84125.00 | 79125.00 | 79375.00 | 80437.50 | 80.44 | 2.13 | 80.44 ± 2.13 | 169.56 | 0.94 | 68.07 | 1.80 | 68.07 ± 1.80 | 0.51 | 1.88 | 26.94 | 0.71 | 26.94 ± 0.71 | 0.95 | | | | | | | | | | | | | | |
| | | 200 | 0.339 | 0.345 | 0.340 | 0.331 | 84750.00 | 86250.00 | 85000.00 | 82750.00 | 84687.50 | 84.69 | 1.25 | 84.69 ± 1.25 | 165.31 | 0.92 | 68.07 | 1.01 | 68.07 ± 1.01 | 0.51 | 1.84 | 27.64 | 0.41 | 27.64 ± 0.41 | 0.95 | | | | | | | | | | | | | | |
| | | 500 | 0.125 | 0.135 | 0.130 | 0.131 | 78125.00 | 84375.00 | 81250.00 | 81875.00 | 81406.25 | 81.41 | 2.23 | 81.41 ± 2.23 | 168.59 | 0.94 | 68.07 | 1.86 | 68.07 ± 1.86 | 0.51 | 1.87 | 27.10 | 0.74 | 27.10 ± 0.74 | 0.95 | | | | | | | | | | | | | | |

ตารางที่ ข3 ปริมาณน้ำคาร์ดิอิกซ์ที่เหลืออยู่ของไอโซเลต DG2 เมื่อใช้กลูโคสเริ่มต้น 100 และ 150 กรัมต่อลิตร และแคลเซียมคาร์บอเนต 30 กรัม

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|---------------|-------|-------|-------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|----------|-------|---------------|--------------|--------|-------|-------|---------------|-------------|------|-------|-------|---------------|-------------|
| | | 50 | 1.186 | 1.233 | 1.239 | 1.240 | 74125.00 | 77062.50 | 77437.50 | 77500.00 | 76531.25 | 76.53 | 1.40 | 76.53 ± 1.40 | 23.47 | 0.13 | 8.34 | 0.15 | 8.34 ± 0.15 | 0.06 | 0.26 | 23.84 | 0.44 | 23.84 ± 0.44 | 0.35 |
| | | 100 | 0.622 | 0.614 | 0.620 | 0.620 | 77750.00 | 76750.00 | 77500.00 | 77500.00 | 77375.00 | 77.38 | 0.38 | 77.38 ± 0.38 | 22.63 | 0.13 | 8.34 | 0.04 | 8.34 ± 0.04 | 0.06 | 0.25 | 24.73 | 0.12 | 24.73 ± 0.12 | 0.35 |
| | | 200 | 0.260 | 0.253 | 0.261 | 0.258 | 65000.00 | 63250.00 | 65250.00 | 64500.00 | 64900.00 | 64.50 | 0.77 | 64.50 ± 0.77 | 35.50 | 0.20 | 8.34 | 0.10 | 8.34 ± 0.10 | 0.06 | 0.39 | 15.76 | 0.19 | 15.76 ± 0.19 | 0.35 |
| | | 500 | 0.109 | 0.112 | 0.112 | 0.111 | 68125.00 | 70000.00 | 70000.00 | 69375.00 | 69375.00 | 69.38 | 0.77 | 69.38 ± 0.77 | 30.63 | 0.17 | 8.34 | 0.09 | 8.34 ± 0.09 | 0.06 | 0.34 | 18.27 | 0.20 | 18.27 ± 0.20 | 0.35 |
| | 2 | 10 | 0.246 | 0.241 | 0.241 | 0.241 | 3075.00 | 3012.50 | 3012.50 | 3012.50 | 3028.13 | 3.03 | 0.03 | 3.03 ± 0.03 | 96.97 | 0.54 | 10.39 | 0.09 | 10.39 ± 0.09 | 0.08 | 1.08 | 7.19 | 0.06 | 7.19 ± 0.06 | 0.22 |
| | | 50 | 0.046 | 0.035 | 0.030 | 0.030 | 2875.00 | 2187.50 | 1875.00 | 1875.00 | 2203.13 | 2.20 | 0.41 | 2.20 ± 0.41 | 97.80 | 0.54 | 10.39 | 1.92 | 10.39 ± 1.92 | 0.08 | 1.09 | 7.13 | 1.32 | 7.13 ± 1.32 | 0.22 |
| | | 100 | 0.028 | 0.025 | 0.011 | 0.025 | 3500.00 | 3125.00 | 1375.00 | 3125.00 | 2781.25 | 2.78 | 0.83 | 2.78 ± 0.83 | 97.22 | 0.54 | 10.39 | 3.08 | 10.39 ± 3.08 | 0.08 | 1.08 | 7.17 | 2.13 | 7.17 ± 2.13 | 0.22 |
| | 3 | 10 | 0.208 | 0.234 | 0.208 | 0.234 | 2600.00 | 2925.00 | 2600.00 | 2925.00 | 2762.50 | 2.76 | 0.16 | 2.76 ± 0.16 | 97.24 | 0.54 | 24.40 | 1.44 | 24.40 ± 1.44 | 0.18 | 1.08 | 16.84 | 0.99 | 16.84 ± 0.99 | 0.34 |
| | | 50 | 0.035 | 0.031 | 0.030 | 0.029 | 2187.50 | 1937.50 | 1875.00 | 1812.50 | 1953.13 | 1.95 | 0.14 | 1.95 ± 0.14 | 98.05 | 0.54 | 24.40 | 1.78 | 24.40 ± 1.78 | 0.18 | 1.09 | 16.70 | 1.22 | 16.70 ± 1.22 | 0.34 |
| | | 100 | 0.005 | 0.018 | 0.005 | 0.004 | 625.00 | 2250.00 | 625.00 | 500.00 | 1000.00 | 1.00 | 0.72 | 1.00 ± 0.72 | 99.00 | 0.55 | 24.40 | 17.65 | 24.40 ± 17.65 | 0.18 | 1.10 | 16.54 | 11.97 | 16.54 ± 11.97 | 0.34 |
| | 150 | 0 | ไม่ได้พิจารณา | | | | | | | | 150000.00 | 150.00 | | | | | | | | | | | | | |
| | | 1 | 10 | 2.408 | 2.408 | 2.408 | 2.408 | 30100.00 | 30100.00 | 30100.00 | 30100.00 | 30100.00 | 30.10 | 0.00 | 30.10 ± 0.00 | 119.90 | 0.67 | 6.69 | 0.00 | 6.69 ± 0.00 | 0.05 | 1.33 | 3.74 | 0.00 | 3.74 ± 0.00 |
| 50 | | | 1.587 | 1.661 | 1.661 | 1.600 | 99187.50 | 103812.50 | 103812.50 | 100000.00 | 101703.13 | 101.70 | 2.13 | 101.70 ± 2.13 | 48.30 | 0.27 | 6.69 | 0.14 | 6.69 ± 0.14 | 0.05 | 0.54 | 9.30 | 0.19 | 9.30 ± 0.19 | 0.28 |
| 100 | | | 0.845 | 0.875 | 0.850 | 0.851 | 105625.00 | 109375.00 | 106250.00 | 106375.00 | 106906.25 | 106.91 | 1.45 | 106.91 ± 1.45 | 43.09 | 0.24 | 6.69 | 0.09 | 6.69 ± 0.09 | 0.05 | 0.48 | 10.42 | 0.14 | 10.42 ± 0.14 | 0.28 |
| 200 | | | 0.449 | 0.454 | 0.430 | 0.440 | 112250.00 | 113500.00 | 107500.00 | 110000.00 | 110812.50 | 110.81 | 2.29 | 110.81 ± 2.29 | 39.19 | 0.22 | 6.69 | 0.14 | 6.69 ± 0.14 | 0.05 | 0.44 | 11.46 | 0.24 | 11.46 ± 0.24 | 0.28 |
| 2 | | 10 | 2.382 | 2.382 | 2.382 | 2.381 | 29775.00 | 29775.00 | 29775.00 | 29762.50 | 29771.88 | 29.77 | 0.01 | 29.77 ± 0.01 | 120.23 | 0.67 | 13.15 | 0.00 | 13.15 ± 0.00 | 0.10 | 1.34 | 7.34 | 0.00 | 7.34 ± 0.00 | 0.27 |
| | | 50 | 1.281 | 1.281 | 1.280 | 1.281 | 80062.50 | 80062.50 | 80000.00 | 80062.50 | 80046.88 | 80.05 | 0.03 | 80.05 ± 0.03 | 69.95 | 0.39 | 13.15 | 0.00 | 13.15 ± 0.00 | 0.10 | 0.78 | 12.62 | 0.00 | 12.62 ± 0.00 | 0.27 |
| | | 100 | 0.658 | 0.663 | 0.650 | 0.663 | 82250.00 | 82875.00 | 81250.00 | 82875.00 | 82312.50 | 82.31 | 0.66 | 82.31 ± 0.66 | 67.69 | 0.38 | 13.15 | 0.11 | 13.15 ± 0.11 | 0.10 | 0.75 | 13.04 | 0.11 | 13.04 ± 0.11 | 0.27 |
| | | 200 | 0.328 | 0.333 | 0.331 | 0.332 | 82000.00 | 83250.00 | 82750.00 | 83000.00 | 82750.00 | 82.75 | 0.47 | 82.75 ± 0.47 | 67.25 | 0.37 | 13.15 | 0.07 | 13.15 ± 0.07 | 0.10 | 0.75 | 13.12 | 0.07 | 13.12 ± 0.07 | 0.27 |
| | | 500 | 0.154 | 0.138 | 0.132 | 0.160 | 96250.00 | 86250.00 | 82500.00 | 100000.00 | 91250.00 | 91.25 | 7.13 | 91.25 ± 7.13 | 58.75 | 0.33 | 13.15 | 1.03 | 13.15 ± 1.03 | 0.10 | 0.65 | 15.02 | 1.17 | 15.02 ± 1.17 | 0.27 |
| 3 | | 10 | 2.016 | 2.142 | 2.141 | 2.142 | 25200.00 | 26775.00 | 26762.50 | 26775.00 | 26378.13 | 26.38 | 0.68 | 26.38 ± 0.68 | 123.62 | 0.69 | 39.71 | 1.02 | 39.71 ± 1.02 | 0.30 | 1.37 | 21.56 | 0.56 | 21.56 ± 0.56 | 0.55 |
| | | 50 | 0.397 | 0.420 | 0.420 | 0.421 | 24812.50 | 26250.00 | 26250.00 | 26312.50 | 25906.25 | 25.91 | 0.63 | 25.91 ± 0.63 | 124.09 | 0.69 | 39.71 | 0.97 | 39.71 ± 0.97 | 0.30 | 1.38 | 21.48 | 0.52 | 21.48 ± 0.52 | 0.55 |
| | | 100 | 0.191 | 0.205 | 0.200 | 0.200 | 23875.00 | 25625.00 | 25000.00 | 25000.00 | 24875.00 | 24.88 | 0.63 | 24.88 ± 0.63 | 125.13 | 0.70 | 39.71 | 1.01 | 39.71 ± 1.01 | 0.30 | 1.39 | 21.30 | 0.54 | 21.30 ± 0.54 | 0.55 |
| | | 200 | 0.085 | 0.103 | 0.091 | 0.100 | 21250.00 | 25750.00 | 22750.00 | 25000.00 | 23687.50 | 23.69 | 1.79 | 23.69 ± 1.79 | 126.31 | 0.70 | 39.71 | 3.00 | 39.71 ± 3.00 | 0.30 | 1.40 | 21.10 | 1.59 | 21.10 ± 1.59 | 0.55 |
| | | 500 | 0.025 | 0.040 | 0.040 | 0.040 | 15625.00 | 25000.00 | 25000.00 | 25000.00 | 22656.25 | 22.66 | 4.06 | 22.66 ± 4.06 | 127.34 | 0.71 | 39.71 | 7.12 | 39.71 ± 7.12 | 0.30 | 1.41 | 20.93 | 3.75 | 20.93 ± 3.75 | 0.55 |

ตารางที่ ข3(ต่อ) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลืออยู่ของไอโซเลต DG2 เมื่อใช้กลูโคสเริ่มต้น 200 และ 250 กรัมต่อลิตร และแคลเซียมคาร์บอเนต 30 กรัม

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-------|------------|-------|-------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|---------------|----------------|---------------|--------|-------|-------------|--------------|--------------|-------|-------|--------------|--------------|--------------|------|
| 250 | 2 | 50 | 1.845 | 2.000 | 2.003 | 2.001 | 115312.50 | 125000.00 | 125187.50 | 125062.50 | 122640.63 | 122.64 | 4.23 | 122.64 ± 4.23 | 11.36 | 0.43 | 6.42 | 0.22 | 6.42 ± 0.22 | 0.05 | 0.86 | 5.57 | 0.19 | 5.57 ± 0.19 | 0.27 | |
| | | 100 | 0.973 | 0.992 | 0.991 | 0.991 | 121625.00 | 124000.00 | 123875.00 | 123875.00 | 123343.75 | 123.34 | 0.99 | 123.34 ± 0.99 | 76.66 | 0.43 | 6.42 | 0.05 | 6.42 ± 0.05 | 0.05 | 0.85 | 5.62 | 0.05 | 5.62 ± 0.05 | 0.27 | |
| | | 200 | 0.613 | 0.623 | 0.610 | 0.609 | 153250.00 | 155750.00 | 152500.00 | 152250.00 | 153437.50 | 153.44 | 1.38 | 128.63 ± 1.70 | 46.56 | 0.26 | 6.42 | 0.06 | 6.42 ± 0.08 | 0.05 | 0.52 | 9.25 | 0.08 | 6.03 ± 0.08 | 0.27 | |
| | | 10 | 2.408 | 2.408 | 2.408 | 2.411 | 30100.00 | 30100.00 | 30100.00 | 30137.50 | 30109.38 | 30.11 | 0.02 | 30.11 ± 0.02 | 169.89 | 0.94 | 8.48 | 0.00 | 8.48 ± 0.00 | 0.06 | 1.89 | 3.35 | 0.00 | 3.35 ± 0.00 | 0.18 | |
| | 50 | 1.653 | 1.724 | 1.721 | 1.699 | 103312.50 | 107750.00 | 107562.50 | 106187.50 | 106203.13 | 106.20 | 1.77 | 106.20 ± 1.77 | 93.80 | 0.52 | 8.48 | 0.14 | 8.48 ± 0.14 | 0.06 | 1.04 | 6.07 | 0.10 | 6.07 ± 0.10 | 0.18 | | |
| | 100 | 0.919 | 0.811 | 0.853 | 0.811 | 114875.00 | 101375.00 | 106625.00 | 101375.00 | 106062.50 | 106.06 | 5.52 | 106.06 ± 5.52 | 93.94 | 0.52 | 8.48 | 0.44 | 8.48 ± 0.44 | 0.06 | 1.04 | 6.06 | 0.32 | 6.06 ± 0.32 | 0.18 | | |
| | 200 | 0.562 | 0.596 | 0.580 | 0.585 | 140500.00 | 149000.00 | 145000.00 | 146250.00 | 145187.50 | 145.19 | 3.07 | 145.19 ± 3.07 | 54.81 | 0.30 | 8.48 | 0.18 | 8.48 ± 0.18 | 0.06 | 0.61 | 10.38 | 0.22 | 10.38 ± 0.22 | 0.18 | | |
| | 3 | 10 | 2.382 | 2.395 | 2.391 | 2.395 | 29775.00 | 29937.50 | 29887.50 | 29937.50 | 29884.38 | 29.88 | 0.07 | 29.88 ± 0.07 | 170.12 | 0.95 | 36.85 | 0.08 | 36.85 ± 0.08 | 0.27 | 1.89 | 14.54 | 0.03 | 14.54 ± 0.03 | 0.51 | |
| | | 50 | 0.962 | 0.941 | 0.953 | 0.951 | 60125.00 | 58812.50 | 59562.50 | 59437.50 | 59484.38 | 59.48 | 0.47 | 59.48 ± 0.47 | 140.52 | 0.78 | 36.85 | 0.29 | 36.85 ± 0.29 | 0.27 | 1.56 | 17.60 | 0.14 | 17.60 ± 0.14 | 0.51 | |
| | | 100 | 0.501 | 0.531 | 0.509 | 0.523 | 62625.00 | 66375.00 | 63625.00 | 65375.00 | 64500.00 | 64.50 | 1.46 | 64.50 ± 1.46 | 135.50 | 0.75 | 36.85 | 0.84 | 36.85 ± 0.84 | 0.27 | 1.51 | 18.26 | 0.41 | 18.26 ± 0.41 | 0.51 | |
| | | 200 | 0.224 | 0.312 | 0.230 | 0.250 | 56000.00 | 78000.00 | 57500.00 | 62500.00 | 63500.00 | 63.50 | 8.71 | 63.50 ± 8.71 | 136.50 | 0.76 | 36.85 | 5.06 | 36.85 ± 5.06 | 0.27 | 1.52 | 18.12 | 2.49 | 18.12 ± 2.49 | 0.51 | |
| | | 500 | 0.078 | 0.130 | 0.129 | 0.125 | 48750.00 | 81250.00 | 80625.00 | 78125.00 | 72187.50 | 72.19 | 13.58 | 72.19 ± 13.58 | 127.81 | 0.71 | 36.85 | 6.93 | 36.85 ± 6.93 | 0.27 | 1.42 | 19.35 | 3.64 | 19.35 ± 3.6 | 0.51 | |
| | 250 | 0 | ไม่ตั้งฉาก | | | | | | | | 250000.00 | 250.00 | | | | | | | | | | | | | | |
| | | 1 | 10 | 2.659 | 2.659 | 2.659 | 2.659 | 33237.50 | 33237.50 | 33237.50 | 33237.50 | 33237.50 | 33.24 | 0.00 | 33.24 ± 0.00 | 216.76 | 1.20 | 10.36 | 0.00 | 10.36 ± 0.00 | 0.08 | 2.41 | 3.21 | 0.00 | 3.21 ± 0.00 | 0.43 |
| | | | 50 | 2.466 | 2.466 | 2.408 | 2.451 | 154125.00 | 154125.00 | 150500.00 | 153187.50 | 152984.38 | 152.98 | 1.48 | 152.98 ± 1.48 | 97.02 | 0.54 | 10.36 | 0.10 | 10.36 ± 0.10 | 0.08 | 1.08 | 7.17 | 0.07 | 7.17 ± 0.07 | 0.43 |
| | | | 100 | 1.544 | 1.558 | 1.520 | 1.568 | 193000.00 | 194750.00 | 190000.00 | 196000.00 | 193437.50 | 193.44 | 2.25 | 193.44 ± 2.25 | 56.56 | 0.31 | 10.36 | 0.12 | 10.36 ± 0.12 | 0.08 | 0.63 | 12.30 | 0.14 | 12.30 ± 0.14 | 0.43 |
| 200 | | | 0.960 | 0.961 | 0.968 | 0.960 | 240000.00 | 240250.00 | 242000.00 | 240000.00 | 240562.50 | 240.56 | 0.84 | 240.56 ± 0.84 | 9.44 | 0.05 | 10.36 | 0.04 | 10.36 ± 0.04 | 0.08 | 0.10 | 73.70 | 0.26 | 73.70 ± 0.26 | 0.43 | |
| 2 | | 10 | 2.635 | 2.659 | 2.659 | 2.659 | 32937.50 | 33237.50 | 33237.50 | 33237.50 | 33162.50 | 33.16 | 0.13 | 33.16 ± 0.13 | 216.84 | 1.20 | 14.38 | 0.06 | 14.38 ± 0.06 | 0.11 | 2.41 | 4.45 | 0.02 | 4.45 ± 0.02 | 0.30 | |
| | | 50 | 2.279 | 2.280 | 2.260 | 2.223 | 142437.50 | 142500.00 | 141250.00 | 138937.50 | 141281.25 | 141.28 | 1.44 | 141.28 ± 1.44 | 108.72 | 0.60 | 14.38 | 0.15 | 14.38 ± 0.15 | 0.11 | 1.21 | 8.88 | 0.09 | 8.88 ± 0.09 | 0.30 | |
| | | 100 | 1.287 | 1.368 | 1.363 | 1.413 | 160875.00 | 171000.00 | 170375.00 | 176625.00 | 169718.75 | 169.72 | 5.66 | 169.72 ± 5.66 | 80.28 | 0.45 | 14.38 | 0.48 | 14.38 ± 0.48 | 0.11 | 0.89 | 12.03 | 0.40 | 12.03 ± 0.40 | 0.30 | |
| | | 200 | 0.797 | 0.855 | 0.848 | 0.821 | 199250.00 | 213750.00 | 212000.00 | 205250.00 | 207562.50 | 207.56 | 5.75 | 207.56 ± 5.75 | 42.44 | 0.24 | 14.38 | 0.40 | 14.38 ± 0.40 | 0.11 | 0.47 | 22.75 | 0.63 | 22.75 ± 0.63 | 0.30 | |
| | | 500 | 0.357 | 0.346 | 0.351 | 0.342 | 223125.00 | 216250.00 | 219375.00 | 213750.00 | 218125.00 | 218.13 | 3.51 | 218.13 ± 3.51 | 31.88 | 0.18 | 14.38 | 0.23 | 14.38 ± 0.23 | 0.11 | 0.35 | 30.29 | 0.49 | 30.29 ± 0.49 | 0.30 | |
| 3 | | 10 | 2.515 | 2.515 | 2.533 | 2.533 | 31437.50 | 31437.50 | 31662.50 | 31662.50 | 31550.00 | 31.55 | 0.11 | 31.55 ± 0.11 | 218.45 | 1.21 | 37.78 | 0.13 | 37.78 ± 0.13 | 0.28 | 2.43 | 11.61 | 0.04 | 11.61 ± 0.04 | 0.52 | |
| | | 50 | 1.105 | 0.854 | 1.083 | 0.953 | 69062.50 | 53375.00 | 67687.50 | 59562.50 | 62421.88 | 62.42 | 6.36 | 62.42 ± 6.36 | 187.58 | 1.04 | 37.78 | 3.85 | 37.78 ± 3.85 | 0.28 | 2.08 | 13.52 | 1.38 | 13.52 ± 1.38 | 0.52 | |
| | | 100 | 0.569 | 0.606 | 0.545 | 0.566 | 71125.00 | 75750.00 | 68125.00 | 70750.00 | 71437.50 | 71.44 | 2.75 | 71.44 ± 2.75 | 178.56 | 0.99 | 37.78 | 1.45 | 37.78 ± 1.45 | 0.28 | 1.98 | 14.20 | 0.55 | 14.20 ± 0.55 | 0.52 | |
| | | 200 | 0.398 | 0.405 | 0.386 | 0.410 | 99500.00 | 101250.00 | 96500.00 | 102500.00 | 99937.50 | 99.94 | 2.25 | 99.94 ± 2.25 | 150.06 | 0.83 | 37.78 | 0.85 | 37.78 ± 0.85 | 0.28 | 1.67 | 16.90 | 0.38 | 16.90 ± 0.38 | 0.52 | |
| | | 500 | 0.275 | 0.239 | 0.237 | 0.288 | 171875.00 | 149375.00 | 148125.00 | 180000.00 | 162343.75 | 162.34 | 13.90 | 162.34 ± 13.90 | 87.66 | 0.49 | 37.78 | 3.23 | 37.78 ± 3.23 | 0.28 | 0.97 | 28.93 | 2.48 | 28.93 ± 2.48 | 0.52 | |

ภาคผนวก ค

วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลเมื่อใช้ความเข้มข้นแคลเซียมคาร์บอเนต 10 30 และ 50 กรัมต่อลิตร

1. วิธีเตรียมสารละลายกลูโคสมาตรฐาน

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 ตารางการเจือจางสารละลายกลูโคสมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ

| ความเข้มข้นกลูโคสมาตรฐาน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) | สารละลายกลูโคสมาตรฐาน (มิลลิลิตร) | น้ำกลั่น (มิลลิลิตร) |
|---|--------------------------------------|-------------------------|
| 0 | 0 | 5 |
| 200 | 1 | 4 |
| 400 | 2 | 3 |
| 600 | 3 | 2 |
| 800 | 4 | 1 |
| 1000 | 5 | 0 |

จากนั้นทำการเตรียมกราฟมาตรฐานกลูโคส โดยนำสารละลายกลูโคสที่ความเข้มข้นต่างๆที่เตรียมไว้ และทำการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธีดีเอ็นเอส โดยใช้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

2. วิธีเตรียมสารละลายดีเอ็นเอสความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร

ชั่งสาร 3,5-ไดไนโตรซาลิไซลิก 10 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 250 มิลลิลิตร เติมสารละลายต่างๆที่ละน้อย (โซเดียมไฮดรอกไซด์ 2 โมลาร์ : ซิงโครเดียมไฮดรอกไซด์ 16 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร) จากนั้นคนสารละลายทั้งสองให้เข้ากัน จากนั้นทำการเติมโพแทสเซียมทาทาลงไปที่ละน้อยพร้อมกับคนให้เข้ากันจนครบ 300 กรัม และปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 1000 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น เก็บสารละลายที่เตรียมได้และกรองผ่านกระดาษกรองแล้วไว้ในขวดสีชา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค3 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลืออยู่ของไอโซเลต DG2 เมื่อใช้แคลเซียมคาร์บอเนต 10 กรัมต่อลิตร

| ไอโซเลต | OD540 เริ่มต้น | กลูโคสเริ่มต้น | แคลเซียมคาร์บอเนต | เวลา (ชม) | การเจือจาง (x) | OD ₅₄₀ | | | | | | กลูโคสที่เหลือ | | | | | | กลูโคสที่สูญเสีย | | รวมเวลาที่ผลิตได้ | | รวมเวลาที่ผลิตได้ | | รวมเวลาที่ผลิตได้ | | ผลได้ | | | อัตราการผลิต | | | | | | |
|---------|----------------|----------------|-------------------|-----------|----------------|-------------------|-------|--------|------------|-------|----------|----------------|-----------|-----------|------------|-----------|-----------|---------------------|--------------|-------------------|----------------|-------------------|-------|-------------------|-------------|-------------|-------|-------|--------------|-------------|------|--------|------|-------------|------|
| | | | | | | ตัวอย่าง 1 | | | ตัวอย่าง 2 | | | ตัวอย่าง 1 | | | ตัวอย่าง 2 | | | ไม่รวมที่หมักบิลจิก | กรัมต่อลิตร | SD | RS ± SD | กรัมต่อลิตร | (โมล) | กรัมต่อลิตร | SD | MA ± SD | (โมล) | (โมล) | | ร้อยละ | SD | Y ± SD | | | |
| | | | | | | ค่าเฉลี่ย | SD | Y ± SD | ค่าเฉลี่ย | SD | Y ± SD | ค่าเฉลี่ย | SD | Y ± SD | ค่าเฉลี่ย | SD | Y ± SD | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| DG2 | 0.971 | 150 | 10 | 0 | 10 | 2.436 | 2.436 | 2.436 | 2.451 | 2.436 | 2.436 | 34800.00 | 34800.00 | 34800.00 | 35014.29 | 34800.00 | 34800.00 | 34835.71 | 34.84 | 0.08 | 34.84 ± 0.08 | 0.00 | 0.00 | 1.36 | 0.00 | 1.36 ± 0.00 | 0.01 | 0.00 | ทำไม่ได้ | | | | | | |
| | | | | | 50 | 1.762 | 1.787 | 1.904 | 1.867 | 1.796 | 1.683 | 125857.14 | 127642.86 | 136000.00 | 133357.14 | 128285.71 | 120214.29 | 128559.52 | 128.56 | 5.10 | 128.56 ± 5.10 | 0.00 | 0.00 | 1.36 | 0.05 | 1.36 ± 0.05 | 0.01 | 0.00 | | | | | | | |
| | | | | | 100 | 0.947 | 1.040 | 1.050 | 0.864 | 0.965 | 0.837 | 135285.71 | 148571.43 | 150000.00 | 123428.57 | 137857.14 | 119571.43 | 135785.71 | 135.79 | 11.44 | 135.79 ± 11.44 | 0.00 | 0.00 | 1.36 | 0.11 | 1.36 ± 0.11 | 0.01 | 0.00 | | | | | | | |
| | | | | | 200 | 0.572 | 0.579 | 0.538 | 0.515 | 0.503 | 0.501 | 163428.57 | 165428.57 | 153714.29 | 147142.86 | 143714.29 | 143142.86 | 152761.90 | 152.76 | 8.95 | 152.76 ± 8.95 | 0.00 | 0.00 | 1.36 | 0.08 | 1.36 ± 0.08 | 0.01 | 0.00 | | | | | | | |
| | | | | | 10 | 2.436 | 2.436 | 2.436 | 2.436 | 2.422 | 2.422 | 34800.00 | 34800.00 | 34800.00 | 34800.00 | 34600.00 | 34600.00 | 34733.33 | 34.73 | 0.09 | 34.73 ± 0.09 | 108.51 | 0.60 | 0.87 | 0.00 | 0.87 ± 0.00 | 0.01 | 1.21 | | | | 0.54 | 0.00 | 0.54 ± 0.00 | 0.04 |
| | | | | | 50 | 1.495 | 1.561 | 1.668 | 1.599 | 1.546 | 1.528 | 106785.71 | 111500.00 | 119142.86 | 114214.29 | 110428.57 | 109142.86 | 111869.05 | 111.87 | 3.96 | 111.87 ± 3.96 | 31.37 | 0.17 | 0.87 | 0.03 | 0.87 ± 0.03 | 0.01 | 0.35 | | | | 1.86 | 0.07 | 1.86 ± 0.07 | 0.04 |
| | | | | | 100 | 0.815 | 0.716 | 0.825 | 0.723 | 0.834 | 0.863 | 116428.57 | 102285.71 | 117857.14 | 103285.71 | 119142.86 | 123285.71 | 113714.29 | 113.71 | 8.01 | 113.71 ± 8.01 | 29.53 | 0.16 | 0.87 | 0.06 | 0.87 ± 0.06 | 0.01 | 0.33 | | | | 1.98 | 0.14 | 1.98 ± 0.14 | 0.04 |
| | | | | | 200 | 0.396 | 0.372 | 0.363 | 0.348 | 0.383 | 0.381 | 113142.86 | 106285.71 | 103714.29 | 99428.57 | 109428.57 | 108857.14 | 106809.52 | 106.81 | 4.39 | 106.81 ± 4.39 | 36.43 | 0.20 | 0.87 | 0.04 | 0.87 ± 0.04 | 0.01 | 0.40 | | | | 1.60 | 0.07 | 1.60 ± 0.07 | 0.04 |
| | | | | | 10 | 2.382 | 2.382 | 2.382 | 2.382 | 2.382 | 2.382 | 34028.57 | 34028.57 | 34028.57 | 34028.57 | 34028.57 | 34028.57 | 34028.57 | 34.03 | 0.00 | 34.03 ± 0.00 | 109.21 | 0.61 | 0.87 | 0.00 | 0.87 ± 0.00 | 0.01 | 1.21 | | | | 0.53 | 0.00 | 0.53 ± 0.00 | 0.02 |
| | | | | | 50 | 1.149 | 1.261 | 1.016 | 1.063 | 0.908 | 1.163 | 82071.43 | 90071.43 | 72571.43 | 75928.57 | 64857.14 | 83071.43 | 78095.24 | 78.10 | 8.11 | 78.10 ± 8.11 | 65.14 | 0.36 | 0.87 | 0.09 | 0.87 ± 0.09 | 0.01 | 0.72 | | | | 0.89 | 0.09 | 0.89 ± 0.09 | 0.02 |
| | | | | | 100 | 0.506 | 0.501 | 0.547 | 0.521 | 0.531 | 0.512 | 72285.71 | 71571.43 | 78142.86 | 74428.57 | 75857.14 | 73142.86 | 74238.10 | 74.24 | 2.24 | 74.24 ± 2.24 | 69.00 | 0.38 | 0.87 | 0.03 | 0.87 ± 0.03 | 0.01 | 0.77 | | | | 0.84 | 0.03 | 0.84 ± 0.03 | 0.02 |
| | | | | | 200 | 0.219 | 0.200 | 0.298 | 0.266 | 0.274 | 0.274 | 62571.43 | 57142.86 | 85142.86 | 76000.00 | 78285.71 | 78285.71 | 72904.76 | 72.90 | 9.77 | 72.90 ± 9.77 | 70.34 | 0.39 | 0.87 | 0.12 | 0.87 ± 0.12 | 0.01 | 0.78 | | | | 0.83 | 0.11 | 0.83 ± 0.11 | 0.02 |
| | | | | 10 | 2.358 | 2.358 | 2.358 | 2.358 | 2.358 | 2.346 | 33685.71 | 33685.71 | 33685.71 | 33685.71 | 33685.71 | 33514.29 | 3366 | 0.06 | 33.66 ± 0.06 | 109.58 | 0.61 | 0.87 | 0.00 | 0.87 ± 0.00 | 0.01 | 1.22 | 0.53 | 0.00 | 0.53 ± 0.00 | 0.01 | | | | | |
| | | | | 50 | 0.689 | 0.659 | 0.658 | 0.756 | 0.718 | 0.651 | 49214.29 | 47071.43 | 47000.00 | 54000.00 | 51285.71 | 46500.00 | 49178.57 | 49.18 | 2.71 | 49.18 ± 2.71 | 94.06 | 0.52 | 0.87 | 0.05 | 0.87 ± 0.05 | 0.01 | 1.05 | 0.62 | 0.03 | 0.62 ± 0.03 | 0.01 | | | | |
| | | | | 100 | 0.302 | 0.334 | 0.295 | 0.288 | 0.290 | 0.237 | 43142.86 | 47714.29 | 42142.86 | 4142.86 | 4142.86 | 33857.14 | 41571.43 | 41.57 | 4.09 | 41.57 ± 4.09 | 101.67 | 0.56 | 0.87 | 0.09 | 0.87 ± 0.09 | 0.01 | 1.13 | 0.58 | 0.06 | 0.58 ± 0.06 | 0.01 | | | | |
| | | | | 10 | 1.959 | 2.128 | 2.197 | 2.165 | 1.904 | 2.000 | 27985.71 | 30400.00 | 31385.71 | 30928.57 | 27200.00 | 28571.43 | 29411.90 | 29.41 | 1.57 | 29.41 ± 1.57 | 113.83 | 0.63 | 0.91 | 0.05 | 0.91 ± 0.05 | 0.01 | 1.26 | 0.54 | 0.03 | 0.54 ± 0.03 | 0.01 | | | | |
| | | | | 50 | 0.428 | 0.450 | 0.444 | 0.384 | 0.395 | 0.448 | 30571.43 | 32142.86 | 31714.29 | 27428.57 | 28214.29 | 32000.00 | 30345.24 | 30.35 | 1.87 | 30.35 ± 1.87 | 112.89 | 0.63 | 0.91 | 0.06 | 0.91 ± 0.06 | 0.01 | 1.25 | 0.54 | 0.03 | 0.54 ± 0.03 | 0.01 | | | | |
| | | | | 5 | 0.937 | 1.006 | 0.976 | 1.143 | 1.160 | 0.895 | 6692.86 | 7185.71 | 6971.43 | 8164.29 | 8285.71 | 7107.14 | 7401.19 | 7.40 | 0.60 | 7.40 ± 0.60 | 135.84 | 0.75 | 0.67 | 0.05 | 0.67 ± 0.05 | 0.00 | 1.51 | 0.33 | 0.03 | 0.33 ± 0.03 | 0.01 | | | | |
| | | | | 10 | 0.418 | 0.442 | 0.463 | 0.386 | 0.454 | 0.464 | 5971.43 | 6314.29 | 6614.29 | 5514.29 | 6485.71 | 6628.57 | 6254.76 | 6.25 | 0.40 | 6.25 ± 0.40 | 136.99 | 0.76 | 0.67 | 0.04 | 0.67 ± 0.04 | 0.00 | 1.52 | 0.33 | 0.02 | 0.33 ± 0.02 | 0.01 | | | | |
| | | | | 50 | 0.057 | 0.049 | 0.041 | 0.056 | 0.051 | 0.050 | 4071.43 | 3500.00 | 2928.57 | 4000.00 | 3642.86 | 3571.43 | 3619.05 | 3.62 | 0.37 | 3.62 ± 0.37 | 139.62 | 0.78 | 0.67 | 0.07 | 0.67 ± 0.07 | 0.00 | 1.55 | 0.32 | 0.03 | 0.32 ± 0.03 | 0.01 | | | | |
| | | | | 5 | 0.625 | 0.732 | 0.652 | 0.657 | 0.688 | 0.737 | 4464.29 | 5228.57 | 4857.14 | 4692.86 | 4914.29 | 5264.29 | 4870.24 | 4.87 | 0.30 | 4.87 ± 0.30 | 138.37 | 0.77 | 3.39 | 0.21 | 3.39 ± 0.21 | 0.03 | 1.54 | 1.64 | 0.10 | 1.64 ± 0.10 | 0.02 | | | | |
| | | | | 10 | 0.284 | 0.273 | 0.285 | 0.241 | 0.293 | 0.327 | 4057.14 | 3900.00 | 4071.43 | 3442.86 | 4185.71 | 4671.43 | 4054.76 | 4.05 | 0.36 | 4.05 ± 0.36 | 139.19 | 0.77 | 3.39 | 0.30 | 3.39 ± 0.30 | 0.03 | 1.55 | 1.64 | 0.15 | 1.64 ± 0.15 | 0.02 | | | | |
| | | | | 50 | 0.041 | 0.033 | 0.026 | 0.035 | 0.030 | 0.032 | 2928.57 | 2357.14 | 1857.14 | 2500.00 | 2142.86 | 2285.71 | 2345.24 | 2.35 | 0.33 | 2.35 ± 0.33 | 140.89 | 0.78 | 3.39 | 0.47 | 3.39 ± 0.47 | 0.03 | 1.57 | 1.62 | 0.23 | 1.62 ± 0.23 | 0.02 | | | | |

