

การผลิตกรดมาลิกจากกากน้ำตาลจากอ้อยโดยเชื้อแบคทีเรีย
ไอโซเลต AG2

PRODUCTION OF MALIC ACID FROM SUGARCANE
MOLASSES BY THE BACTERIUM, ISOLATE AG2

วนิชา หลุกกุล
วรางคณา วงศ์อินตา

โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2560

การผลิตกรดมาลิกจากกากน้ำตาลจากอ้อยโดยเชื้อแบคทีเรีย
ไอโซเลต AG2

PRODUCTION OF MALIC ACID FROM SUGARCANE
MOLASSES BY THE BACTERIUM, ISOLATE AG2

วนิชา

หลุกกุล

วรารัณณา

วงศ์อินตา

โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2560

PRODUCTION OF MALIC ACID FROM SUGARCANE
MOLASSES BY THE BACTERIUM, ISOLATE AG2

WANICHA

LUKKUL

WARANGKANA

WONGINTHA




A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENT FOR
THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE (BIOTECHNOLOGY)
DEPARTMENT OF BIOLOGY, FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
ACADEMIC YEAR 2017

หัวข้อโครงการพิเศษ การผลิตกรดมาลิกจากกากน้ำตาลจากอ้อยโดยเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต AG2
 Production of malic acid from sugarcane by the bacterium, isolate AG2

ชื่อนักศึกษา นางสาววนิษา หลุกกุล รหัสนักศึกษา 57050756
 นางสาวรวงคณา วงศ์อินตา รหัสนักศึกษา 57050758

ปริญญา วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
 ภาควิชา ชีววิทยา
 ปีการศึกษา 2560
 อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร.สมพิศ สอนโยธา

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

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

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
 สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

หัวข้อโครงการพิเศษ	การผลิตกรดมาลิกจากกากน้ำตาลจากอ้อยโดยเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต AG2		
ชื่อนักศึกษา	นางสาววนิษา	หลุกกุล	รหัสนักศึกษา 57050756
	นางสาวรวงคณา	วงศ์อินตา	รหัสนักศึกษา 57050758
ปริญญา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)		
ภาควิชา	ชีววิทยา		
คณะ	วิทยาศาสตร์		
มหาวิทยาลัย	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)		
ปีการศึกษา	2560		
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร.สมพิศ สอนโยธา		

บทคัดย่อ

โครงการพิเศษนี้ได้ทำการศึกษาการผลิตกรดมาลิกด้วยแบคทีเรียไอโซเลต AG2 โดยทำการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร basic medium ที่มีกากน้ำตาลจากอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอน แต่อย่างไรก็ตามในกากน้ำตาลนอกจากประกอบด้วยสารอาหารต่าง ๆ แล้วยังมีองค์ประกอบบางชนิดที่อาจเป็นพิษต่อเซลล์ได้ ดังนั้นเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการนำกากน้ำตาลมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอน ในการศึกษาครั้งนี้จึงได้ทำการปรับสภาพกากน้ำตาลด้วยวิธีการใช้กรดซัลฟูริกที่พีเอช 3.0 และแคลเซียมไฮดรอกไซด์ และวิธีการใช้ถ่านกัมมันต์ ผลการทดลองพบว่าไอโซเลต AG2 สามารถผลิตกรดมาลิกที่อยู่ในรูปแคลเซียมมาเลตได้สูงกว่า เมื่อใช้กากน้ำตาลที่ทำการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกที่พีเอช 3.0 และแคลเซียมไฮดรอกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอน โดยผลิตได้เท่ากับ 19.99 ± 0.56 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้ยังได้ศึกษาผลของการปรับสภาพกากน้ำตาลด้วยกรดซัลฟูริกที่พีเอช 1.0 2.0 และ 3.0 และแคลเซียมไฮดรอกไซด์ พบว่าเมื่อใช้กากน้ำตาลที่ทำการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกที่พีเอช 1.0 และ 2.0 และแคลเซียมไฮดรอกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอน ไอโซเลต AG2 สามารถผลิตแคลเซียมมาเลตได้ใกล้เคียงกันคือ 29.84 ± 0.94 และ 28.70 ± 0.69 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ แต่การปรับสภาพกากน้ำตาลด้วยกรดซัลฟูริกที่พีเอช 2.0 และแคลเซียมไฮดรอกไซด์ใช้สารเคมีน้อยกว่าจึงทำให้มีค่าใช้จ่ายถูกกว่า ดังนั้นจึงถูกเลือกใช้เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อการศึกษาผลของปริมาณแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตกรดมาลิก ซึ่งผลการทดลองพบว่าไอโซเลต AG2 สามารถผลิตแคลเซียมมาเลตได้สูงสุด 25.11 ± 0.19 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหาร ที่มีกากน้ำตาลที่ทำการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกที่พีเอช 2.0 และแคลเซียมไฮดรอกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอน โดยไม่มีการเติมแหล่งไนโตรเจน จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า ไอโซเลต AG2 สามารถใช้กากน้ำตาลซึ่งเป็นวัสดุเหลือทิ้งจากโรงงานผลิตน้ำตาล-

ทรายและเป็นวัตถุดิบที่มีราคาถูกในการผลิตกรดมาลิกได้ ดังนั้นนอกจากจะเป็นการลงทุนในการผลิตกรดมาลิกแล้วยังเป็นการเพิ่มมูลค่าให้แก่วัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมได้อีกด้วย

คำสำคัญ : กากน้ำตาลอ้อย การปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกและแคลเซียมไฮดรอกไซด์ กรดมาลิก
แคลเซียมมาเลต ไอโซเลต AG2

Title	Production of Malic Acid from Sugarcane Molasses by The Bacterium, Isolate AG2		
Students	Miss Wanicha Lukkul	student ID 57050756	
	Miss Warangkana Wongintha	student ID 57050758	
Degree	Bachelor of Science (Biotechnology)		
Department	Biology		
Faculty	Science		
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)		
Academic Year	2017		
Advisor	Asst. Prof. Dr. Somphit Sornyotha		

Abstract

The production of malic acid in calcium malate form by the isolate AG2 when grown in basic medium using sugarcane molasses as a low-cost carbon source was studied. Considering that sugarcane molasses contains nutrients and hazardous substances, thus pretreatment of sugarcane molasses with sulfuric acid at pH 3.0 and calcium hydroxide, and activated carbon to increase the production of calcium malate was examined. Among the above techniques, sulfuric acid at pH 3.0 and calcium hydroxide treatment gave better results regarding calcium malate concentration (19.99 ± 0.56 g/L). Additionally, efficient pretreatment of sugarcane molasses was developed by using sulfuric acid at pH 1.0, 2.0 or 3.0 and calcium hydroxide. The results found that calcium malate produced from the pretreated sugarcane molasses with sulfuric acid at pH 1.0 and calcium hydroxide, and sulfuric acid at pH 2.0 and calcium hydroxide had similar concentration (29.84 ± 0.94 and 28.70 ± 0.69 g/L, respectively). However, utilization of sulfuric acid at pH 2.0 and calcium hydroxide as pretreatment technique was economical and a less chemical added would be beneficial. Therefore, this pretreatment technique was selected for the further fermentation. Furthermore, the effect of the amount of ammonium sulfate as a nitrogen source on calcium malate

production was also studied. The results revealed that isolate AG2 was produced the highest concentration of calcium malate at 25.11 ± 0.19 g/L, when grown in basic medium using pretreated sugarcane molasses with sulfuric acid at pH 2.0 and calcium hydroxide as a carbon source without any additional nitrogen source supplementation. In this study, isolate AG2 could be produced malic acid by using sugar cane molasses, a byproduct of the sugar industry as a carbon source. It was a readily available at relatively low cost, offering a cost-competitive bio-based malic acid for industrial applications and could also be increased the valuable of the byproduct from the sugar industry.

Keywords : Sugarcane molasses, Sulfuric acid and calcium hydroxide pretreatment, Malic acid Calcium malate, Isolate AG2

กิตติกรรมประกาศ

โครงการพิเศษฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี เนื่องมาจากความกรุณาและความร่วมมือของทุก ๆ ท่าน ขอขอบพระคุณท่านอาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร.สมพิศ สอนโยธา ที่คอยให้คำปรึกษาดูแล และให้ความช่วยเหลือแนะนำแนวทางที่ดีในการปรับปรุงข้อบกพร่องในการทำโครงการพิเศษ ตลอดจนให้ความรู้และประสบการณ์ต่าง ๆ และขอขอบพระคุณท่านอาจารย์ประธานกรรมการสอบโครงการพิเศษ ผศ.ดร.ดวงกมล เรืองงาม และท่านอาจารย์กรรมการสอบโครงการพิเศษ อาจารย์ธนาวัต ก่ออนันต์ ที่ให้ข้อคิดเห็นและคำแนะนำช่วยเหลือในการทำโครงการพิเศษนี้ให้มีความเรียบร้อยสมบูรณ์ยิ่งขึ้น คณะผู้จัดทำจึงขอกราบขอบพระคุณมา ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการภาควิชาชีววิทยา เจ้าหน้าที่ห้องธุรการภาควิชาชีววิทยา และเจ้าหน้าที่ฝ่ายอาคารคณะวิทยาศาสตร์ ที่ให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในการทำโครงการพิเศษให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ บิดา มารดา ที่ให้ได้รับการศึกษาตลอดจนคอยเลี้ยงดู อบรมสั่งสอน และเป็นกำลังใจในการทำโครงการพิเศษให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี รวมถึงเพื่อน ๆ และบุคคลอื่น ๆ ที่ไม่ได้กล่าวมา ผู้จัดทำโครงการขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงมา ณ โอกาสนี้

วนิชา หลุกกุล

วรางคณา วงศ์อินตา

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ค
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญรูป.....	ฎ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ.....	1
1.2 วัตถุประสงค์.....	2
1.3 ขอบเขต.....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 กรดมาลิก.....	4
2.2 การผลิตกรดมาลิกด้วยกระบวนการทางเคมี.....	5
2.3 การผลิตกรดมาลิกด้วยกระบวนการทางชีวภาพ.....	6
2.3.1 วิถีเมแทบอลิซึมที่เกี่ยวข้องกับการผลิตกรดมาลิก.....	6
2.3.1.1 วิถีเพนโตสฟอสเฟส.....	8
2.3.1.2 วิถีไกลโคไลซิส.....	11
2.3.1.3 วัฏจักรกรดไตรคาร์บอกซิลิก.....	14
2.3.1.4 วัฏจักรไกลออกซีเลต.....	16
2.3.1.5 ผลผลิตกรดมาลิกที่ได้สูงสุดทางทฤษฎีจากวิถีเมแทบอลิซึมต่าง ๆ.....	17
2.3.2 การผลิตกรดมาลิกจากการไฮโดรไลซิสกรดโพลีมาลิก.....	19
2.3.3 การผลิตกรดมาลิกโดยอาศัยเอนไซม์ฟูมาเรส.....	19
2.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดมาลิก.....	20
2.4.1 สายพันธุ์ของจุลินทรีย์.....	20
2.4.2 ชนิดของแหล่งคาร์บอน.....	23

สารบัญ

(ต่อ)

	หน้า
2.4.3 อัตราส่วนระหว่างแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจน (C/N ratio).....	25
2.4.4 แร่ธาตุและวิตามิน.....	25
2.4.5 สารปรับสภาพค่าพีเอชให้เป็นกลาง (Neutralizing agents).....	26
2.5 การประยุกต์ใช้กรดมาลิก.....	27
2.5.1 อุตสาหกรรมการผลิตเครื่องสำอางค์.....	27
2.5.2 อุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม.....	27
2.5.3 อุตสาหกรรมโพลีเมอร์.....	27
2.6 กากน้ำตาลจากอ้อย.....	28
2.6.1 กระบวนการปรับสภาพกากน้ำตาล.....	28
2.6.1.1 การตกตะกอนทางเคมี.....	28
2.6.1.2 การแลกเปลี่ยนไอออน.....	29
2.6.1.3 การดูดซับ.....	30
2.6.1.4 การกรองผ่านเยื่อเลือกผ่าน.....	30
2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	33
2.7.1 การผลิตกรดซักซินิกจากกากน้ำตาลจากอ้อยโดย <i>Actinobacillus succinogenes</i>	33
2.7.2 ความสามารถในการผลิตกรดแลคติกโดยใช้อาหารที่มีแหล่งคาร์บอนเป็น กากน้ำตาลร่วมกับน้ำตาลกลูโคส.....	34
2.7.3 ผลของน้ำตาล 3 ชนิดที่เป็นองค์ประกอบหลักในกากน้ำตาลจากอ้อยต่อ การผลิตกรดบิวทีริกโดย <i>Clostridium tyrobutyricum</i>	35
บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย.....	37
3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์.....	37
3.2 สารเคมี.....	38
3.3 ขั้นตอนการดำเนินงาน.....	39

สารบัญ

(ต่อ)

	หน้า
3.3.1 แบบที่เรียที่ใช้ในการศึกษา.....	39
3.3.2 การเตรียมหัวเชื้อแบบที่เรียตั้งต้น.....	39
3.3.3 การปรับสภาพกากน้ำตาล.....	40
3.3.3.1 การปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกและแคลเซียมไฮดรอกไซด์.....	40
3.3.3.2 การปรับสภาพด้วยถ่านกัมมันต์.....	40
3.3.4 กระบวนการหมักแบบที่เรียไอโซเลต AG2 ในฟลาสก์.....	40
3.3.4.1 ศึกษาผลของวิธีการปรับสภาพกากน้ำตาลต่อการผลิตกรดมาลิก.....	40
3.3.4.2 ศึกษาผลของการปรับสภาพกากน้ำตาลด้วยกรดซัลฟูริกที่ค่าพีเอช แตกต่างกันต่อการผลิตกรดมาลิก.....	41
3.3.4.3 ศึกษาผลของปริมาณแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตกรดมาลิก.....	41
3.3.5 การเก็บตัวอย่างเพื่อนำไปวิเคราะห์.....	41
3.3.6 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธีดีเอ็นเอส.....	41
3.3.7 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธีฟินอล-ซัลฟูริก.....	42
3.3.8 การตกตะกอนแคลเซียมมาเลต.....	42
3.3.9 การวิเคราะห์ปริมาณแคลเซียมมาเลตด้วยวิธีการไทเทรต.....	42
3.3.10 การวิเคราะห์เพื่อเปรียบเทียบค่าทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS.....	42
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล.....	43
4.1 ผลของวิธีการปรับสภาพกากน้ำตาลต่อการผลิตกรดมาลิกโดยแบบที่เรีย ไอโซเลต AG2.....	43
4.2 ผลของการปรับสภาพกากน้ำตาลด้วยกรดซัลฟูริกที่ค่าพีเอชแตกต่างกันต่อการผลิต กรดมาลิกโดยแบบที่เรียไอโซเลต AG2.....	48
4.3 ผลของปริมาณแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตกรดมาลิกโดยแบบที่เรียไอโซเลต AG2.....	52
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	56

สารบัญ

(ต่อ)

	หน้า
5.1 สรุปผลการวิจัย.....	56
5.2 ข้อเสนอแนะ.....	56
เอกสารอ้างอิง.....	57
ภาคผนวก.....	66
ภาคผนวก ก สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ.....	67
ภาคผนวก ข การเตรียมสารละลายสำหรับการวิเคราะห์.....	68
ภาคผนวก ค การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ.....	77

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 แสดงผลผลิตกรดมาลิก อัตราการผลิตกรดมาลิก และค่าผลได้ที่ได้จาก กระบวนการหมักน้ำตาลกลูโคสโดยจุลินทรีย์สายพันธุ์ธรรมชาติ.....	21
2.2 แสดงผลผลิตกรดมาลิก อัตราการผลิตกรดมาลิก และค่าผลได้ที่ได้จาก กระบวนการหมักน้ำตาลกลูโคสโดยจุลินทรีย์ที่ตัดแต่งพันธุกรรม.....	22
2.3 แสดงผลผลิตกรดมาลิกและค่าผลได้ที่ได้จากกระบวนการหมักจุลินทรีย์โดยใช้ แหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ.....	24
2.4 ส่วนประกอบของกากน้ำตาลจากอ้อยในประเทศต่าง ๆ.....	32
2.5 แสดงผลผลิตกรดซัคซินิคจากการเพาะเลี้ยง <i>A. succinogenes</i> โดยใช้ กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนในขวดที่สภาวะไม่มีอากาศ.....	33
4.1 แสดงผลของวิธีการปรับสภาพกากน้ำตาลต่อปริมาณแคลเซียมมาเลต ผลได้ และอัตราการผลิตกรดมาลิกโดยเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต AG2.....	44
4.2 ผลของการปรับค่าพีเอชกากน้ำตาลที่ทำการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกและ แคลเซียมไฮดรอกไซด์ต่อปริมาณแคลเซียมมาเลต ผลได้ และอัตราการผลิตกรดมาลิกโดยแบคทีเรียไอโซเลต AG2.....	49
4.3 ผลของปริมาณแหล่งไนโตรเจนต่อปริมาณแคลเซียมมาเลต ผลได้ และอัตราการผลิตกรดมาลิกโดยแบคทีเรียไอโซเลต AG2.....	52
ข.1 แสดงการเตรียมสารละลายกลูโคสมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่าง ๆ.....	68
ข.2 แสดงการเตรียมสารละลายกลูโคสมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่าง ๆ.....	70
ข.3 แสดงปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือเมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียไอโซเลต AG2 ในอาหารสูตร basic medium โดยใช้กากน้ำตาลที่ทำการปรับสภาพ ด้วยวิธีที่แตกต่างกันเป็นแหล่งคาร์บอน.....	74
ข.4 แสดงปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือเมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียไอโซเลต AG2 ในอาหารสูตร basic medium โดยใช้แหล่งคาร์บอนเป็นกากน้ำตาลที่ทำการ ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกที่ค่าพีเอชแตกต่างกัน.....	75

สารบัญตาราง

(ต่อ)

ตารางที่	หน้า
ข.5 แสดงปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือเมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียไอโซเลต AG2 ในอาหารสูตร basic medium โดยใช้แหล่งไนโตรเจนเป็นแอมโมเนียมซัลเฟต ในปริมาณที่แตกต่างกัน.....	76
ค.1 การวิเคราะห์ค่าทางสถิติของปริมาณแคลเซียมมาเลต ค่าผลได้ และอัตราการผลิตกรดมาลิกจากกากน้ำตาลที่ทำการปรับสภาพด้วยวิธีแตกต่างกันโดยแบคทีเรียไอโซเลต AG2.....	77
ค.2 แสดงการเปรียบเทียบปริมาณแคลเซียมมาเลต ผลได้ และอัตราการผลิตกรดมาลิกจากกากน้ำตาลที่ทำการปรับสภาพด้วยวิธีแตกต่างกันโดยแบคทีเรียไอโซเลต AG2 ด้วยวิธี Duncan ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05.....	78
ค.3 การวิเคราะห์ค่าทางสถิติของปริมาณแคลเซียมมาเลต ค่าผลได้ และอัตราการผลิตกรดมาลิกที่ได้จากกากน้ำตาลที่ทำการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกที่ค่าพีเอชแตกต่างกันโดยแบคทีเรียไอโซเลต AG2.....	79
ค.4 แสดงการเปรียบเทียบปริมาณแคลเซียมมาเลต ค่าผลได้ และอัตราการผลิตกรดมาลิกจากกากน้ำตาลที่ทำการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกที่ค่าพีเอชแตกต่างกันโดยแบคทีเรียไอโซเลต AG2 ด้วยวิธี Duncan ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05.....	80
ค.5 การวิเคราะห์ค่าทางสถิติของปริมาณแคลเซียมมาเลต ค่าผลได้ และอัตราการผลิตกรดมาลิกจากการใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ปริมาณแตกต่างกันโดยแบคทีเรียไอโซเลต AG2.....	81
ค.6 แสดงการเปรียบเทียบปริมาณแคลเซียมมาเลตค่าผลได้ และอัตราการผลิตกรดมาลิกจากการใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ปริมาณแตกต่างกันโดยแบคทีเรียไอโซเลต AG2 ด้วยวิธี Duncan ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05.....	82

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 รูปแสดงโครงสร้างของ L และ D form ของกรดมาลิก.....	4
2.2 รูปแสดงร้อยละการแตกตัวของกรดมาลิกที่ค่าพีเอชต่าง ๆ.....	4
2.3 แสดงปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในกระบวนการผลิตกรดมาลิกทางเคมี.....	6
2.4 แสดงวิธีหมักแบบอซิซึมสำหรับการผลิตกรดอินทรีย์ใน <i>Aspergilli</i>	7
2.5 แสดงวิธีการเปลี่ยนน้ำตาลไซโลสเป็นไซลูโลส-5-ฟอสเฟตในแบคทีเรียและในเชื้อรา.....	8
2.6 แสดงวิธีเพนโตสฟอสเฟตแบบไม่ใช้ออกซิเจน.....	10
2.7 แสดงวิธีไกลโคไลซิส.....	12
2.8 แสดงกระบวนการสังเคราะห์สารเมแทบอลิต์ต่าง ๆ โดยใช้ไพรูเวตเป็นสารตั้งต้น.....	13
2.9 แสดงวัฏจักรกรดไตรคาร์บอกซิลิก.....	15
2.10 แสดงวัฏจักรไกลออกซีเลต.....	16
2.11 แสดงวัฏจักรกรดซิตริกแบบผันกลับ (Reverse tricarboxylic acid, rTCA) วัฏจักรกรดไตรคาร์บอกซิลิก (tricarboxylic acid cycle, TCA cycle) วัฏจักรไกลออกซีเลต (glyoxylate cycle) และวัฏจักรไกลออกซีเลตแบบไม่เต็มวง (noncyclic glyoxylate shunt).....	18
2.12 แสดงปฏิกิริยาไฮเดรชันกรดฟูมาริกเป็นกรดมาลิก.....	19
2.13 แสดงการใช้แคลเซียมคาร์บอเนตเป็นสารปรับสภาพค่าพีเอชให้เป็นกลางและ กระบวนการผลิตกรดมาลิกที่ได้ผลิตภัณฑ์อยู่ในรูปแคลเซียมมาเลต.....	26
4.1 กราฟแสดงปริมาณน้ำตาลที่เหลือ (A) และค่าพีเอช (B) เมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย ไอโซเลต AG2 เป็นเวลา 6 วัน ในอาหารสูตร basic medium ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็น กากน้ำตาลที่ไม่ปรับสภาพ (●) กากน้ำตาลที่ปรับสภาพด้วยกรด (◆) และกากน้ำตาลที่ปรับสภาพด้วยถ่าน (▲).....	45
4.2 กราฟแสดงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ (A) และค่าพีเอช (B) เมื่อทำการเพาะเลี้ยง แบคทีเรียไอโซเลต AG2 เป็นเวลา 6 วัน ในอาหารสูตร basic medium ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกากน้ำตาลที่ทำการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกที่ค่าพีเอช เท่ากับ 1.0 (●) ค่าพีเอชเท่ากับ 2.0 (◆) และค่าพีเอชเท่ากับ 3.0 (▲).....	51

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.3 กราฟแสดงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ (A) และค่าพีเอช (B) เมื่อทำการเพาะเลี้ยง แบคทีเรียไอโซเลต AG2 เป็นเวลา 6 วัน ในอาหารสูตร basic medium ที่ใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนในปริมาณที่แตกต่างกัน คือ 0 (●), 1.000 (■), 2.000 (◆) และ 4.000 (▲) กรัมต่อลิตร.....	55

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

กรดมาลิก คือ กรดไดคาร์บอกซิลิกที่มีคาร์บอนเป็นองค์ประกอบ 4 อะตอม ถูกจัดเป็นหนึ่งในสารเคมี 12 รายการที่สามารถใช้เป็นสาร Building Block โดยกระทรวงพลังงานของประเทศสหรัฐอเมริกา (Department of Energy, DOE) (Werpy และคณะ, 2004) ซึ่งสามารถผลิตได้จากชีวมวลและถูกนำไปใช้ประโยชน์ได้หลากหลาย เช่น ใช้เป็นสารให้กลิ่นรส สารเพิ่มความข้นหนืดในอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องสำอาง นำมาใช้ในการทำความสะอาดโลหะ การตกแต่งสิ่งทอ การย้อมผ้า การบำบัดน้ำเสีย (Cheng และคณะ, 2017) และเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์สารเคมีที่มีคาร์บอน 4 อะตอม เช่น 3-hydroxybutyrolactone, 1, 2, 4-trihydroxy-butane และ 3, 4-dihydroxybutyric acid-1-methyl ester เป็นต้น (Hollingworth, 2003)

กรดมาลิกสามารถผลิตได้ทั้งจากกระบวนการทางเคมีและกระบวนการทางชีวภาพ โดยการผลิตกรดมาลิกทางเคมีเกิดจากปฏิกิริยา isomerization เพื่อเปลี่ยนกรดมาลิกเป็นกรดฟูมาริก จากนั้นทำปฏิกิริยา hydration กรดฟูมาริกเพื่อเปลี่ยนเป็นกรดมาลิกภายใต้สภาวะที่มีอุณหภูมิและความดันสูง (Ahlgren, 1968) สำหรับการผลิตกรดมาลิกทางชีวภาพนั้น สามารถผลิตได้จากวิถีเมแทบอลิซึมในเซลล์จุลินทรีย์ และในปัจจุบันงานวิจัยส่วนใหญ่มีความสนใจในการผลิตกรดมาลิกโดยอาศัยกระบวนการหมักด้วยจุลินทรีย์ เนื่องจากให้ผลผลิตเป็นกรดมาลิกบริสุทธิ์ คือมีโครงสร้างแบบ L form เพียงอย่างเดียว และเป็นกระบวนการที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม เพราะสามารถใช้วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรและอุตสาหกรรมเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตกรดมาลิกได้ ซึ่งจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตกรดมาลิกได้ เช่น *Aspergillus niger*, *A. flavus* (West, 2011) *A. oryzae* (Knuf และคณะ, 2013) *Saccharomyces cerevisiae* (Nakayama และคณะ, 2012) *Monascus araneosus* ST91 (Lumyong และ Tomita, 1993) และ *Schizophyllum commune* (Kawagoe และคณะ, 1997) เป็นต้น โดยจุลินทรีย์เหล่านี้สามารถผลิตกรดมาลิกได้โดยใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน และเนื่องจากอ้อยเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย โดยประเทศไทยสามารถปลูกอ้อยเป็นอันดับ 4 ของโลก รองจากประเทศจีน อินเดีย และบราซิล ซึ่งอ้อยส่วนใหญ่ในประเทศไทยถูกนำไปใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตน้ำตาลประมาณ 100.1 ล้านเมตริกตันต่อปี (The Daily Records, 2017) โดยในปี 2560 ประเทศไทยมีพื้นที่เพาะปลูกอ้อย 1.758 ล้านไร่ มีผลผลิตอ้อยรวมทั้งหมด 94.7 ล้านตัน และมีประสิทธิภาพในการผลิตน้ำตาล 107.90 กิโลกรัมต่อตัน ในปัจจุบันมีโรงงานน้ำตาลทั้งหมด 51 แห่ง มีศักยภาพในการผลิตน้ำตาล 10 ล้านตันต่อปี นอกจากจะได้น้ำตาลเป็นผลผลิตแล้วยังได้ขาน-

อ้อยและกากน้ำตาลเป็นผลพลอยได้จากการผลิตด้วย (Chunhawong และคณะ, 2018) จึงทำให้มีกากน้ำตาลซึ่งเป็นวัสดุเหลือทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมการผลิตน้ำตาลเป็นจำนวนมาก ดังนั้นโครงการพิเศษนี้จึงต้องการศึกษาการผลิตกรดมาลิกด้วยวิธีการทางชีวภาพ โดยการใช้กากน้ำตาลซึ่งเป็นวัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมเป็นแหล่งคาร์บอนด้วยแบคทีเรียไอโซเลต AG2 ซึ่งคัดแยกได้จากฝรั่งนำโดยประภัสสร และ สุพรรณิกา (2557) เพื่อนำผลการทดลองที่ได้ไปใช้เป็นแนวทางในการผลิตกรดมาลิกจากวัตถุดิบที่มีราคาถูกต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการพิเศษ

1. เพื่อศึกษาการผลิตกรดมาลิกโดยแบคทีเรียไอโซเลต AG2 ด้วยกระบวนการหมักที่มีกากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน
2. เพื่อศึกษาวิธีการปรับสภาพกากน้ำตาลต่อการผลิตกรดมาลิกโดยแบคทีเรียไอโซเลต AG2
3. เพื่อศึกษาผลของปริมาณแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตกรดมาลิกโดยแบคทีเรียไอโซเลต-AG2

1.3 ขอบเขตของโครงการพิเศษ

1. ทำการปรับสภาพกากน้ำตาลด้วยวิธีการ 2 วิธีคือ 1) การปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกและแคลเซียมไฮดรอกไซด์ (Cheng และคณะ, 2017) และ 2) การปรับสภาพด้วยถ่านกัมมันต์ (Activated charcoal) (Wei และคณะ, 2017)
2. ศึกษาการผลิตกรดมาลิกโดยแบคทีเรียไอโซเลต AG2 โดยใช้กากน้ำตาลที่ทำการปรับสภาพด้วยวิธีที่แตกต่างกัน และกากน้ำตาลที่ไม่ปรับสภาพเป็นแหล่งคาร์บอน
3. ศึกษาผลของปริมาณแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตกรดมาลิกโดยแบคทีเรียไอโซเลต AG2
4. ทำการตกตะกอนแคลเซียมมาเลตด้วยแอลกอฮอล์ (Wang และคณะ, 2013)
5. ทำการวิเคราะห์ปริมาณแคลเซียมมาเลตด้วยวิธีการไทเทรต (FAO, 2006)
6. ทำการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธีดีเอ็นเอส (Miller, 1959)
7. ทำการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธีฟินอล-ซัลฟูริก (Dubois และคณะ, 1956)
8. ทำการวิเคราะห์ค่าทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS (Statistical Package for the Social-Science)

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถใช้แบคทีเรียที่แยกได้จากธรรมชาติมาผลิตกรดมาลิกในกระบวนการหมักโดยใช้วัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมเป็นแหล่งคาร์บอน
2. เพื่อใช้เป็นแนวทางในการผลิตกรดมาลิกจากการใช้ของเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมเป็นวัตถุดิบ
3. เพิ่มมูลค่าของวัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรม

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

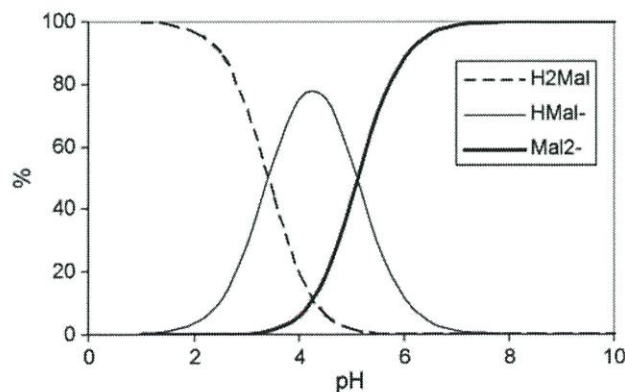
2.1 กรดมาลิก

กรดมาลิกหรือ 2-ไฮดรอกซีบิวเทนไดโออิก คือกรดไตรคาร์บอกซิลิกที่มีคาร์บอน 4 อะตอม และเป็นสารตัวกลางในวัฏจักรกรดไตรคาร์บอกซิลิก (Tricarboxylic acid cycle, TCA cycle) มีสูตรทางเคมีคือ $C_4H_6O_5$ มีโครงสร้าง 2 แบบคือ L และ D form (ดังรูปที่ 2.1) (Zhou และคณะ, 2000) เมื่อผลิตทางชีวภาพจะได้แบบ L form ส่วนการผลิตทางเคมีจะได้ทั้งแบบ L และ D form กรดมาลิกมีลักษณะทางกายภาพเป็นผลึกสีขาวและละลายน้ำได้ดี (Marais และคณะ, 2005) กรดมาลิกเป็นกรดอ่อนที่สามารถแตกตัวให้โปรตอนได้สองครั้ง มีค่า pK_{a1} เท่ากับ 3.40 และ pK_{a2} เท่ากับ 5.11 โดยที่ค่าพีเอชในช่วง 5.8 – 6.0 จะเกิดการแตกตัวอย่างสมบูรณ์ ส่วนใหญ่อยู่ในรูปของมาเลต (Malate) มากกว่าร้อยละ 85 โดยมวลต่อปริมาตร แสดงดังรูปที่ 2.2 (Lameloise และคณะ, 2009)



รูปที่ 2.1 รูปแสดงโครงสร้างของ L และ D form ของกรดมาลิก

ที่มา : Michielsen และคณะ (2000)



รูปที่ 2.2 แสดงร้อยละการแตกตัวของกรดมาลิกที่ค่าพีเอชต่าง ๆ โดยเส้นปะ คือ กรดมาลิก (Malic-acid) เส้นทึบบาง คือ ไฮโดรเจนมาเลต (Hydrogen-malate) และเส้นทึบหนา คือ มาเลต (Malate)

ที่มา : Lameloise และคณะ (2009)

กรดมาลิกถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ เช่น อาหาร สารเคมี ยา และการเกษตร เป็นต้น (Liu และคณะ, 2015) นอกจากนี้ยังสามารถนำมาใช้ในการทำความสะอาดโลหะ การตกแต่งสิ่งทอ การบำบัดน้ำเสีย การย้อมผ้า รวมถึงการสังเคราะห์ทางเคมีของกรดโพลีมาลิก ซึ่งสามารถนำไปผลิตเป็นพลาสติกย่อยสลายได้ (Cheng และคณะ, 2017; Wei และคณะ, 2017) กรดมาลิกถูกจัดเป็นหนึ่งในสารเคมี 12 รายการที่สามารถใช้เป็นสาร building block โดยกระทรวงพลังงานของประเทศสหรัฐอเมริกา (Department of Energy, DOE) (Werpy และคณะ, 2004) ซึ่งสามารถเปลี่ยนเป็นสารตั้งต้นในอุตสาหกรรมต่าง ๆ ได้อย่างหลากหลาย (Werpy และ Petersen, 2004) และคาดว่าในอนาคตจะมีการใช้กรดมาลิก 40,000-60,000 ตันต่อปี (Deng และคณะ, 2016)

กรดมาลิกสามารถผลิตได้ทั้งจากกระบวนการทางเคมีและกระบวนการทางชีวภาพ โดยการผลิตกรดมาลิกทางเคมีเกิดจากปฏิกิริยา isomerization เปลี่ยนกรดมาลิกเป็นกรดฟูมาริก จากนั้นทำปฏิกิริยา hydration กรดฟูมาริกเป็นกรดมาลิกภายใต้สภาวะที่มีอุณหภูมิและความดันสูง (Ahlgren, 1968) สำหรับการผลิตกรดมาลิกทางชีวภาพนั้นสามารถผลิตได้จากวิถีเมแทบอลิซึมในเซลล์จุลินทรีย์ ในปัจจุบันงานวิจัยส่วนใหญ่มีความสนใจในการผลิตกรดมาลิกโดยอาศัยการหมักด้วยจุลินทรีย์ ซึ่งจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตกรดมาลิกได้ เช่น *Aspergillus niger*, *A. flavus* (West, 2011), *A. oryzae* (Knuf และคณะ, 2013), *Saccharomyces cerevisiae* (Nakayama และคณะ, 2012), *Monascus araneosus* ST91 (Lumyong และ Tomita, 1993) และ *Schizophyllum commune* (Kawagoe และคณะ, 1997) เป็นต้น

2.2 การผลิตกรดมาลิกด้วยกระบวนการทางเคมี

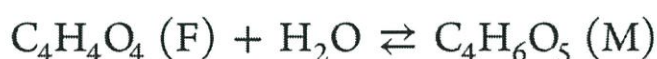
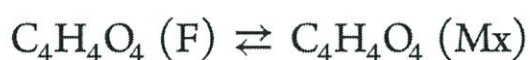
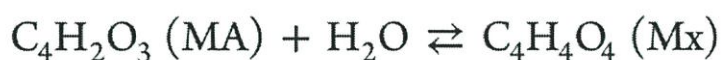
การผลิตกรดมาลิกด้วยกระบวนการทางเคมี ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน แสดงดังรูปที่ 2.3 คือ
 ขั้นตอนที่ 1 การเกิดปฏิกิริยาไฮเดรชัน (Hydration) โดยการเติมน้ำ 1 โมเลกุล ให้แก่มาลิก แอนไฮไดรด์ (Maleic anhydride) และเกิดเป็นกรดมาลิก (Maleic acid)

ขั้นตอนที่ 2 การเกิดปฏิกิริยาไอโซเมโรเซชัน (Isomerization) โดยการเปลี่ยนกรดมาลิกไปเป็นกรดฟูมาริก (Fumaric acid) โดยมีกรดไฮโดรคลอริก (HCl) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

ขั้นตอนที่ 3 การเกิดปฏิกิริยาไฮเดรชัน (Hydration) โดยการเติมน้ำ 1 โมเลกุล ให้แก่กรดฟูมาริกและเกิดเป็นกรดมาลิก (Malic acid) โดยมีกรดไฮโดรคลอริกเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

โดยปฏิกิริยาดังกล่าวนั้นจะเกิดขึ้นที่อุณหภูมิสูงกว่า 423 เคลวิน ความดัน 1400 กิโลปาสคาล เป็นเวลา 3-5 ชั่วโมง เมื่อแล้วเสร็จจะให้ผลิตภัณฑ์ที่ประกอบด้วย กรดมาลิกร้อยละ 40 - 60 โดยมวลต่อปริมาตรกรดฟูมาริกร้อยละ 40 - 60 โดยมวลต่อปริมาตร และกรดมาลิกร้อยละ

2 - 3 โดยมวลต่อปริมาตร จากนั้นจึงเข้าสู่กระบวนการทำให้บริสุทธิ์ (Purification) ด้วยวิธีการตกตะกอนและการกรองกรดฟูมาरिकออกที่อุณหภูมิต่ำ (เพราะเป็นสภาวะที่กรดฟูมาरिकมีความสามารถในการละลายน้ำได้ไม่ดี) แล้วจึงทำการตกผลึก (Crystallization) เป็นกรดมาลิก (DL-malic acid) ซึ่งมีลักษณะเป็นผงสีขาวที่มีส่วนประกอบของกรดฟูมาरिकและกรดมาลิกคือน้อยกว่าร้อยละ 1 และ 0.05 โดยมวลต่อมวล ตามลำดับ (Ortiz และคณะ, 2017)



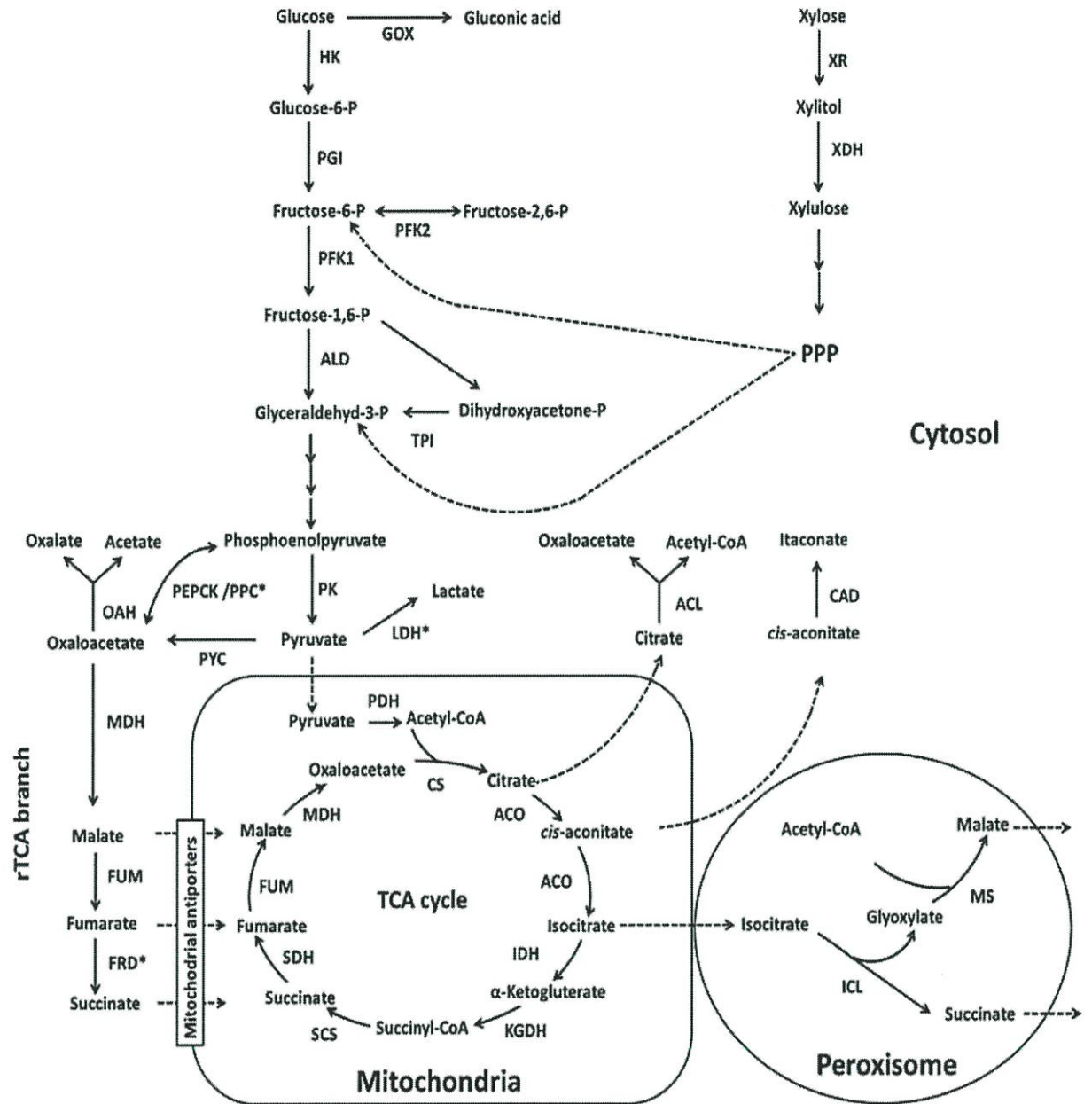
รูปที่ 2.3 แสดงปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในกระบวนการผลิตกรดมาลิกทางเคมี โดย (MA) คือ มาลิก-แอนไฮไดรด์ (Maleic anhydride), (Mx) คือ กรดมาลิก (Maleic acid), (F) คือ กรดฟูมาरिक (Fumaric acid) และ (M) คือ กรดมาลิก (Malic acid)

ที่มา : Ortiz และคณะ (2017)

2.3 การผลิตกรดมาลิกด้วยกระบวนการทางชีวภาพ

2.3.1 วิถีเมแทบอลิซึมที่เกี่ยวข้องกับการผลิตกรดมาลิก

การผลิตกรดมาลิกจากกระบวนการทางชีวภาพนั้น สามารถผลิตได้จากวิถีเมแทบอลิซึมต่าง ๆ ในเซลล์จุลินทรีย์ แสดงดังรูปที่ 2.4 เมื่อมีแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคส กลูโคสจะถูกย่อยสลายโดยวิถีไกลโคไลซิส (Glycolysis pathway) ได้ผลิตภัณฑ์เป็นไพรูเวต จากนั้นไพรูเวตจะเข้าสู่วิถีเมแทบอลิซึมการผลิตกรดมาลิก คือ วิถีวัฏจักรกรดซิตริกแบบผันกลับ (Reverse tricarboxylic acid, rTCA) หรือวัฏจักรกรดไตรคาร์บอกซิลิก (Tricarboxylic acid cycle, TCA cycle) หรือวัฏจักรไกลออกซีเลต (Glyoxylate cycle) ส่วนแหล่งคาร์บอนที่เป็นไซโลสนั้น จะต้องถูกเปลี่ยนเป็นไซลูโลส-5-ฟอสเฟต (Xylulose-5-phosphate) ก่อนเข้าสู่วิถีเพนโตสฟอสเฟต (Pentose phosphate pathway, PPP) และวิถีไกลโคไลซิส ตามลำดับ

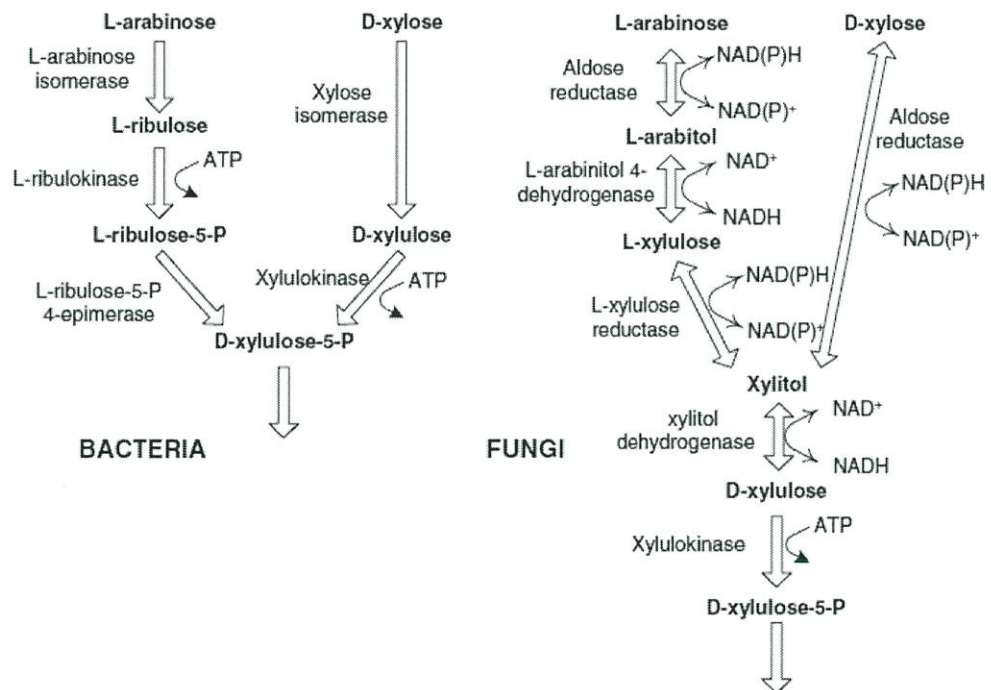


รูปที่ 2.4 แสดงวิถีเมแทบอลิซึมสำหรับการผลิตกรดอินทรีย์ใน *Aspergilli*

ที่มา : Yang และคณะ (2017)

2.3.1.1 วิธีเพนโทสฟอสเฟต (Pentose phosphate pathway)

จุลินทรีย์จำเป็นจะต้องเปลี่ยนน้ำตาลไซโลสเป็นไซลูโลส-5-ฟอสเฟต (Xylulose-5-phosphate) ก่อนจึงจะเข้าสู่วิธีเพนโทสฟอสเฟต และวิธีไกลโคไลซิสต่อไปตามลำดับ โดยในแบคทีเรียไซโลสจะถูกเปลี่ยนเป็นไซลูโลส (Xylulose) โดยเอนไซม์ไซโลส ไอโซเมอเรส (Xylose isomerase) แล้วเกิดปฏิกิริยาฟอสโฟรีเลชันไซลูโลสเป็นไซลูโลส-5-ฟอสเฟต โดยเอนไซม์ไซลูโลไคเนส (Xylulokinase) มีการใช้พลังงาน ATP 1 โมเลกุล ส่วนในเชื้อราจะเกิดการเปลี่ยนไซโลสเป็นไซลิตอล (Xylitol) โดยเอนไซม์อัลโดส รีดักเทส (Aldose reductase) มี $\text{NAD(P)}^+/\text{NAD(P)H}$ เป็นโคแฟกเตอร์ จากนั้นไซลิตอลจะถูกออกซิไดซ์เป็นไซลูโลสโดยเอนไซม์ไซลิตอล ดีไฮโดรจีเนส (Xylitol dehydrogenase) แล้วเกิดปฏิกิริยาฟอสโฟรีเลชันไซลูโลสเป็นไซลูโลส-5-ฟอสเฟต โดยเอนไซม์ไซลูโลไคเนส และมีการใช้พลังงาน ATP 1 โมเลกุล เช่นกัน แสดงดังรูปที่ 2.5



รูปที่ 2.5 แสดงวิธีการเปลี่ยนน้ำตาลไซโลสเป็นไซลูโลส-5-ฟอสเฟตในแบคทีเรีย (รูปซ้ายมือ) และในเชื้อรา (รูปขวามือ)

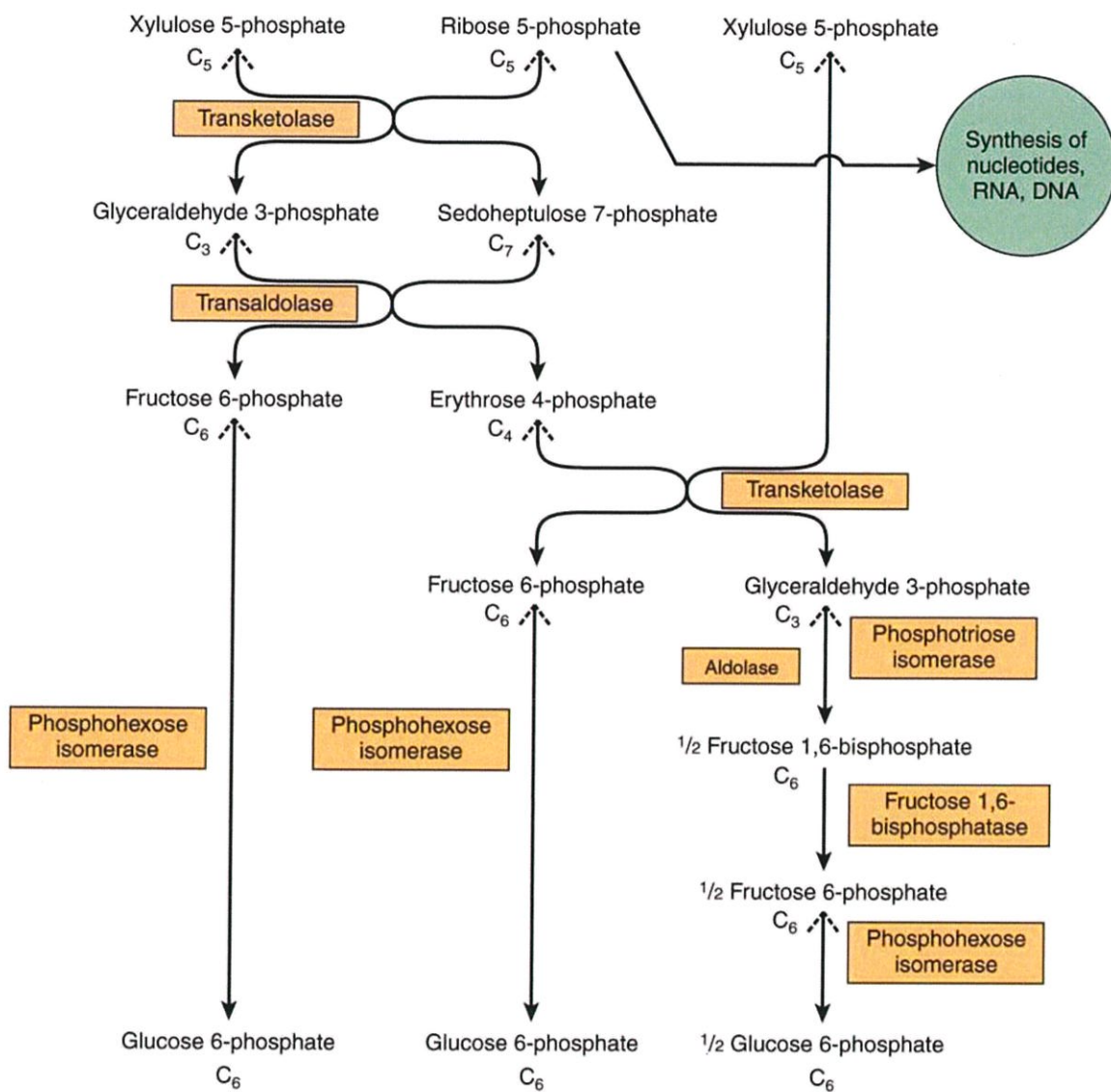
ที่มา : Hahn-Hägerdal และคณะ (2007)

เมื่อได้ ไกลูโคส-5-ฟอสเฟต แล้วจะเข้าสู่วิถีเพนโทสฟอสเฟตแบบไม่ใช้ออกซิเจน (non-oxidative pentose phosphate pathway) แสดงดังรูปที่ 2.6 โดยจะเกิดการเปลี่ยนน้ำตาลคาร์บอน 5 อะตอมนี้ไปเป็นสารตัวกลางของวิถีไกลโคไลซิส คือ ฟรุกโตส-6-ฟอสเฟต (Fructose-6-phosphate) 2 โมเลกุล และ กลีเซอรอลดีไฮด์-3-ฟอสเฟต (Glyceraldehyde-3-phosphate) 1 โมเลกุล โดยมีขั้นตอนต่าง ๆ ดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 เกิดการย้ายคาร์บอน 2 อะตอม จาก ไกลูโคส-5-ฟอสเฟต ไปรวมกับ ไรโบส-5-ฟอสเฟต (Ribose-5-phosphate) โดยเอนไซม์ทรานคีโตเลส (Transketolase) เป็น ซีโดเฮปทุโลส-7-ฟอสเฟต (Sedoheptulose-7-phosphate) และ กลีเซอรอลดีไฮด์-3-ฟอสเฟต

ขั้นตอนที่ 2 เกิดการย้ายคาร์บอน 3 อะตอม จาก ซีโดเฮปทุโลส-7-ฟอสเฟต ไปรวมกับ กลีเซอรอลดีไฮด์-3-ฟอสเฟต โดยเอนไซม์ทรานอัลโดเลส (Transaldolase) เป็น ฟรุกโตส-6-ฟอสเฟต และ อิริโทรส-4-ฟอสเฟต (Erythrose-4-phosphate) ซึ่งปฏิกิริยานี้จะเหมือนกับปฏิกิริยาของ เอนไซม์อัลโดเลส (Aldolase) ในวิถีไกลโคไลซิส

ขั้นตอนที่ 3 เกิดการรวมตัวกันของ อิริโทรส-4-ฟอสเฟต กับ ไกลูโคส-5-ฟอสเฟต โดยเอนไซม์ทรานคีโตเลส เป็น ฟรุกโตส-6-ฟอสเฟต และ กลีเซอรอลดีไฮด์-3-ฟอสเฟต



รูปที่ 2.6 แสดงวิถีเพนโทสฟอสเฟตแบบไม่ใช้ออกซิเจน

ที่มา : Murray และคณะ (2012)

2.3.1.2 วิถีไกลโคไลซิส (Glycolysis pathway) (Pelley และคณะ, 2007)

วิถีไกลโคไลซิสเป็นกระบวนการสลายกลูโคส 1 โมเลกุล เป็นกรดไพรูวิก 2 โมเลกุล แสดงดังรูปที่ 2.7 โดยจะเกิดขึ้นภายในไซโตพลาสซึม มี 10 ขั้นตอน ดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 การเกิดปฏิกิริยาฟอสโฟรีเลชัน (Phosphorylation) กลูโคส เป็นกลูโคส-6-ฟอสเฟต (Glucose-6-phosphate) ต้องใช้พลังงาน 1 ATP โดยมีเอนไซม์เฮกโซไคเนส (Hexokinase, HK) หรือ กลูโคไคเนส (Glucokinase) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

ขั้นตอนที่ 2 การเกิดปฏิกิริยาเปลี่ยน กลูโคส-6-ฟอสเฟต เป็นฟรุกโตส-6-ฟอสเฟต (Fructose-6-phosphate) โดยเอนไซม์ฟอสโฟกลูโคส ไอโซเมอเรส (Phosphoglucose isomerase, PGI)

ขั้นตอนที่ 3 การเกิดปฏิกิริยาเปลี่ยน ฟรุกโตส-6-ฟอสเฟต เป็นฟรุกโตส-1,6-บิสฟอสเฟต (Fructose-1,6-bisphosphate) โดยเอนไซม์ฟอสโฟฟรุกโตไคเนส-1 (Phosphofruktokinase-1, PFK-1) ซึ่งเป็นเอนไซม์ควบคุมวิถีไกลโคไลซิส (rate-limiting enzyme of glycolysis) ใช้พลังงาน 1 ATP

ขั้นตอนที่ 4 การเกิดปฏิกิริยาสลาย ฟรุกโตส-1,6-บิสฟอสเฟต เป็นสารตัวกลางที่มีคาร์บอน 3 อะตอม (ไตรโอสฟอสเฟต, Triose phosphate) จำนวน 2 โมเลกุล คือ ไดไฮดรอกซีอะซิโตนฟอสเฟต (Dihydroxyacetone phosphate, DHAP) และ กลีเซอรอลดีไฮด์-3-ฟอสเฟต (Glyceraldehyde-3-phosphate) โดยเอนไซม์อัลโดเลส (Aldolase) ต่อมาไดไฮดรอกซีอะซิโตนฟอสเฟต จึงถูกเปลี่ยนเป็น กลีเซอรอลดีไฮด์-3-ฟอสเฟต โดยเอนไซม์ไตรโอสฟอสเฟต ไอโซเมอเรส (Triose phosphate isomerase, TP isomerase) นอกจากนี้ยังสามารถเปลี่ยนเป็น กลีเซอรอล-3-ฟอสเฟต (Glycerol-3-phosphate) ได้ด้วยเอนไซม์กลีเซอรอล-3-ฟอสเฟต ดีไฮโดรจีเนส (Glycerol-3-phosphate dehydrogenase) โดยใช้ NADH เป็นโคแฟกเตอร์

ขั้นตอนที่ 5 การเกิดปฏิกิริยาเปลี่ยน กลีเซอรอลดีไฮด์-3-ฟอสเฟต เป็น 1,3-บิสฟอสโฟกลีเซอเรต (1,3-bisphosphoglycerate) โดยเอนไซม์กลีเซอรอลดีไฮด์-3-ฟอสเฟต ดีไฮโดรจีเนส (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) โดยใช้ NAD^+ เป็นโคแฟกเตอร์ และได้ NADH 1 โมเลกุล เป็นผลิตภัณฑ์

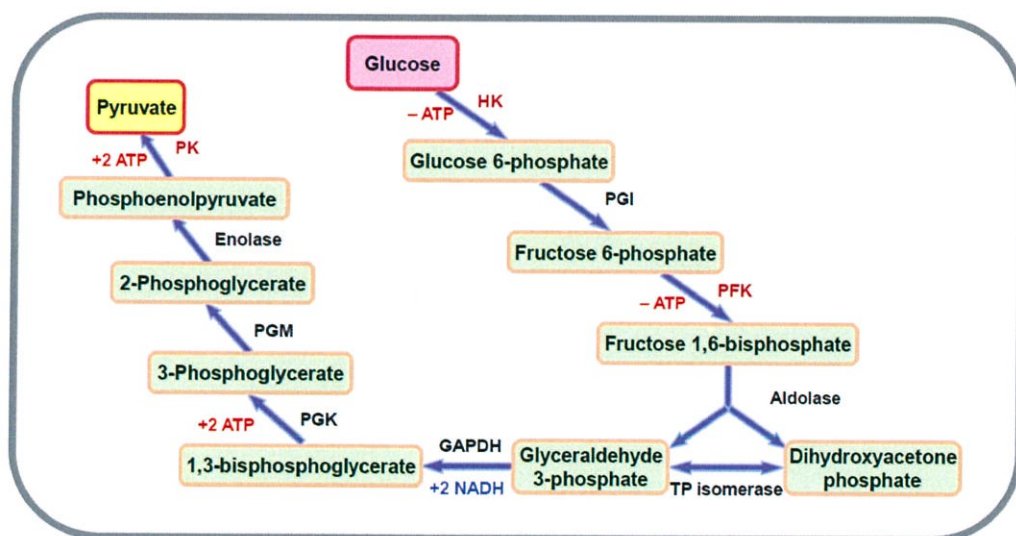
ขั้นตอนที่ 6 การเกิดปฏิกิริยาเปลี่ยน 1,3-บิสฟอสโฟกลีเซอเรต เป็น 3-ฟอสโฟกลีเซอเรต (3-phosphoglycerate) โดยเอนไซม์ฟอสโฟกลีเซอเรต ไคเนส (Phosphoglycerate kinase, PGK) ปฏิกิริยานี้จะให้พลังงาน 2 ATP ต่อกลูโคส 1 โมเลกุล ทดแทนพลังงานที่ถูกใช้ไปในขั้นตอนที่ 1 และ

ขั้นตอนที่ 7 การเกิดปฏิกิริยาเปลี่ยน 3-ฟอสโฟกลีเซอเรต เป็น 2-ฟอสโฟกลีเซอเรต (2-phosphoglycerate) โดยเอนไซม์ฟอสโฟกลีเซอเรต มิวเตส (Phosphoglycerate mutase, PGM)

ขั้นตอนที่ 8 การเกิดปฏิกิริยาเปลี่ยน 2-ฟอสโฟกลีเซอเรต เป็นฟอสโฟอินอลไพรูเวต (Phosphoenolpyruvate, PEP) โดยเอนไซม์อินอลเลส (enolase)

ขั้นตอนที่ 9 การเกิดปฏิกิริยาเปลี่ยน ฟอสโฟอินอลไพรูเวต เป็นไพรูเวต (Pyruvate) โดยเอนไซม์ไพรูเวต ไคเนส (Pyruvate kinase) ซึ่งเอนไซม์นี้จะถูก ฟรุกโตส-1,6-บิสฟอสเฟต ที่เป็นผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาของฟอสโฟฟรุกโตไคเนส-1 (PFK-1) เป็นตัวกระตุ้นให้ทำงาน โดยปฏิกิริยานี้จะให้พลังงาน 2 ATP ต่อกลูโคส 1 โมเลกุล

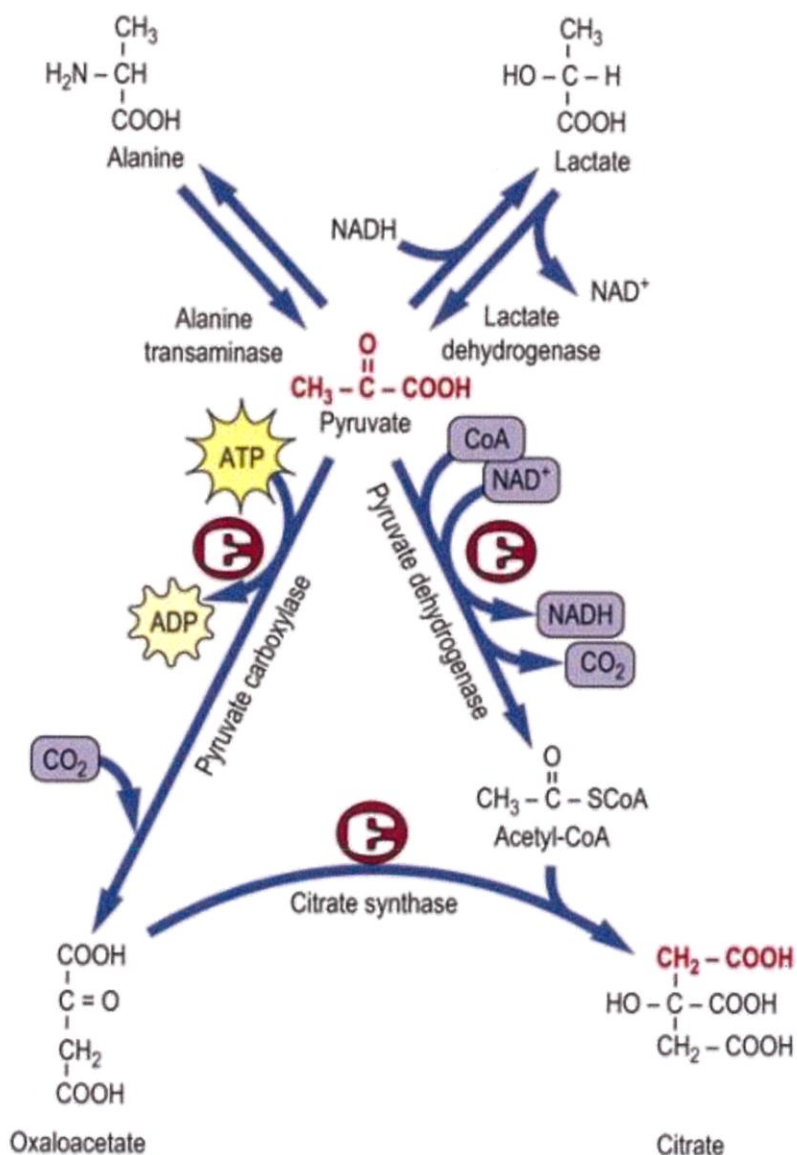
ขั้นตอนที่ 10 การเกิดปฏิกิริยาเปลี่ยน ไพรูเวต เป็นแลคเตต (Lactate) โดยเอนไซม์แลคเตต ดีไฮโดรจีเนส (Lactate dehydrogenase) และใช้ NADH เป็นโคแฟกเตอร์ ซึ่งปฏิกิริยานี้จะเกิดขึ้นในกระบวนการย่อยสลายกลูโคสแบบไม่ใช้ออกซิเจน ดังนั้น ในกรณีนี้จึงได้ ไพรูเวต เป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย



รูปที่ 2.7 แสดงวิถีไกลโคไลซิส

ที่มา : Li และคณะ (2014)

โดยผลิตภัณฑ์ไพรูเวตที่ได้นั้นสามารถเปลี่ยนเป็นสารเมแทบอลิต์ต่าง ๆ คือ แลคเตต (Lactate) โดยเอนไซม์แลคเตต ดีไฮโดรจีเนส (Lactate dehydrogenase) อะลานีน (Alanine) โดยเอนไซม์อะลานีน อะมิโนทรานเฟอเรส (Alanine aminotransferase, ALT) ออกซาโลอะซิเตต (Oxaloacetate) โดยเอนไซม์ไพรูเวต คาร์บอกซิเลส (Pyruvate carboxylase) และ อะซิติลโคเอนไซม์ เอ (Acetyl-CoA) โดยเอนไซม์ไพรูเวต ดีไฮโดรจีเนส คอมเพลกซ์ (Pyruvate dehydrogenase complex) แสดงดังรูปที่ 2.8



รูปที่ 2.8 แสดงกระบวนการสังเคราะห์สารเมแทบอลิต์ต่าง ๆ โดยใช้ไพรูเวตเป็นสารตั้งต้น

ที่มา : Baynes และ Dominiczak (2014)

2.3.1.3 วัฏจักรกรดไตรคาร์บอกซิลิก (Tricarboxylic acid cycle, TCA cycle)

วัฏจักรกรดไตรคาร์บอกซิลิกหรือวัฏจักรเครบส์ (Kreb's cycle) หรือวัฏจักรกรดซิตริก (Citric acid cycle) จะเกิดขึ้นภายในไมโทคอนเดรีย มีทั้งหมด 8 ขั้นตอน (แสดงดังรูปที่ 2.9) ดังนี้

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

ขั้นตอนที่ 2 การเกิดปฏิกิริยาเปลี่ยนซิเตรตเป็นไอโซซิเตรต (Isocitrate) โดยเอนไซม์อะโคนิเตส (Aconitase) เกิดปฏิกิริยา 2 ขั้นตอนย่อย คือการเกิดปฏิกิริยาดีไฮเดรชัน (Dehydration) ดึงน้ำออกจากซิเตรต 1 โมเลกุล เกิดเป็น ซิสอะโคนิเตต (*Cis*-aconitate) จากนั้นจะเกิดปฏิกิริยาไฮเดรชัน (Hydration) เติมน้ำให้แก่ซิสอะโคนิเตต 1 โมเลกุล เกิดเป็นไอโซซิเตรต

ขั้นตอนที่ 3 การเกิดปฏิกิริยาดีคาร์บอกซิเลชัน (Decarboxylation) ของไอโซซิเตรตเป็นแอลฟา-คีโตกลูตาเรต (α -Ketoglutarate) โดยเอนไซม์ไอโซซิเตรต ดีไฮโดรจีเนส (Isocitrate dehydrogenase) ได้ CO_2 1 โมเลกุล และมีการสร้าง $\text{NADH} + \text{H}^+$ จาก NAD^+

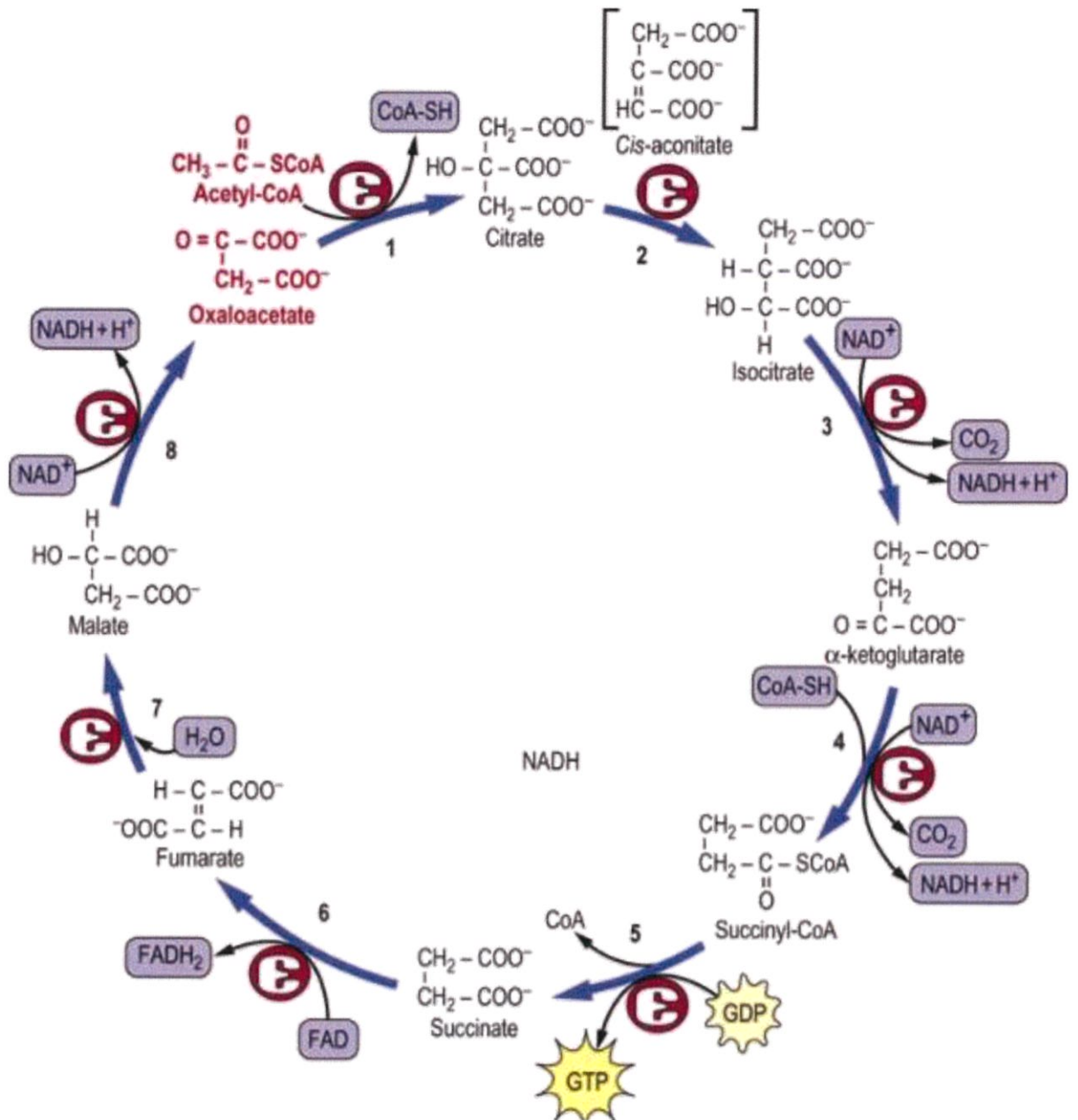
ขั้นตอนที่ 4 การเกิดปฏิกิริยาดีคาร์บอกซิเลชันของแอลฟา-คีโตกลูตาเรตเป็นซัคซินิลโคเอนไซม์ เอ (Succinyl-CoA) โดยเอนไซม์แอลฟา-คีโตกลูตาเรต ดีไฮโดรจีเนส (α -Ketoglutarate dehydrogenase) ได้ CO_2 1 โมเลกุล และมีการสร้าง $\text{NADH} + \text{H}^+$ จาก NAD^+

ขั้นตอนที่ 5 การเกิดปฏิกิริยาเปลี่ยนซัคซินิลโคเอนไซม์ เอ เป็นซัคซิเนต (Succinate) โดยเอนไซม์ซัคซินิลโคเอนไซม์ เอ ซินทีเทส (Succinyl-CoA synthetase) ซึ่งซัคซินิลโคเอนไซม์ เอ มีหมู่ CoA อิสระที่จะถูกแทนที่ด้วยหมู่ฟอสเฟต (Pi) แล้วเกิดการส่งต่อหมู่ฟอสเฟตไปยัง GDP ได้เป็น GTP โดยปฏิกิริยานี้จะมีการเติมน้ำ 1 โมเลกุล

ขั้นตอนที่ 6 การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Oxidation) ของซัคซิเนตเป็นฟูมาเรต (Fumarate) โดยเอนไซม์ซัคซิเนต ดีไฮโดรจีเนส (Succinate dehydrogenase) และมีการให้ไฮโดรเจนกับ FAD ได้เป็น FADH_2

ขั้นตอนที่ 7 การเกิดปฏิกิริยาเติมน้ำ 1 โมเลกุล ให้กับฟูมาเรตเกิดเป็นแอล-มาเลต (L-malate) โดยเอนไซม์ฟูมาเรส (Fumarase)

ขั้นตอนที่ 8 การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของแอล-มาเลตเป็นออกซาโลอะซิเตต โดยเอนไซม์มาเลต ดีไฮโดรจีเนส (Malate dehydrogenase) และมีการให้ไฮโดรเจนกับ NAD^+ ได้เป็น $\text{NADH} + \text{H}^+$



รูปที่ 2.9 แสดงวัฏจักรกรดไตรคาร์บอกซิลิก

ที่มา : Baynes และ Dominiczak (2014)

2.3.1.4 วัฏจักรไกลออกซีเลต (Glyoxylate cycle)

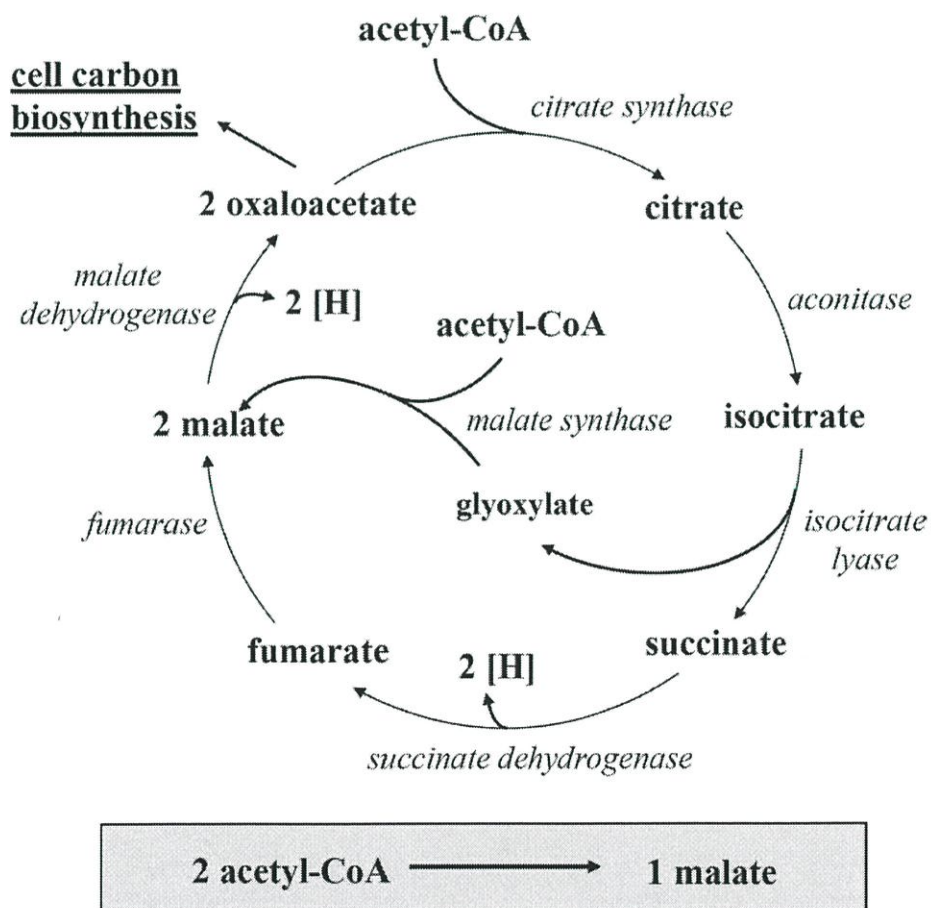
วัฏจักรไกลออกซีเลตเป็นกระบวนการสังเคราะห์กรดมาลิกหรือมาเลต 1 โมเลกุล จาก อะซิติลโคเอนไซม์ เอ 2 โมเลกุล ประกอบไปด้วย 4 ขั้นตอน (แสดงดังรูปที่ 2.10) ดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 การเกิดปฏิกิริยาควบแน่น (Condensation) โดยอะซิติลโคเอนไซม์ เอ (Acetyl-CoA) จะรวมตัวกับออกซาโลอะซิเตต (Oxaloacetate) เป็นซิเตรต (Citrate) โดยเอนไซม์ ซิเตรต ซินเทส (Citrate synthase)

ขั้นตอนที่ 2 การเกิดปฏิกิริยาเปลี่ยนซิเตรตเป็นไอโซซิเตรต (Isocitrate) โดยเอนไซม์อะโคนิเตส (Aconitase)

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

ขั้นตอนที่ 4 การเกิดปฏิกิริยาควบแน่น (Condensation) โดยอะซิติลโคเอนไซม์ เอ (Acetyl-CoA) จะรวมตัวกับไกลออกซีเลต ได้เป็นมาเลต (Malate)



รูปที่ 2.10 แสดงวัฏจักรไกลออกซีเลต

ที่มา : Erb และคณะ (2007)

2.3.1.5 ผลผลิตกรดมาลิกที่ได้สูงสุดทางทฤษฎีจากวิถีเมแทบอลิซึมต่าง ๆ

การผลิตกรดมาลิกจากวิถีเมแทบอลิซึม 4 วิธี ได้แก่ วัฏจักรกรดซิตริกแบบผันกลับ (Reverse tricarboxylic acid, rTCA) วัฏจักรกรดไตรคาร์บอกซิลิก (tricarboxylic acid cycle, TCA cycle) วัฏจักรไกลออกซีเลต (glyoxylate cycle) และวัฏจักรไกลออกซีเลตแบบไม่เต็มวง (noncyclic glyoxylate shunt) แสดงดังรูปที่ 2.11 (Goldberg และคณะ, 2006; Zelle และคณะ, 2008) สามารถให้ผลผลิตสูงสุดทางทฤษฎีต่างกัน ดังนี้

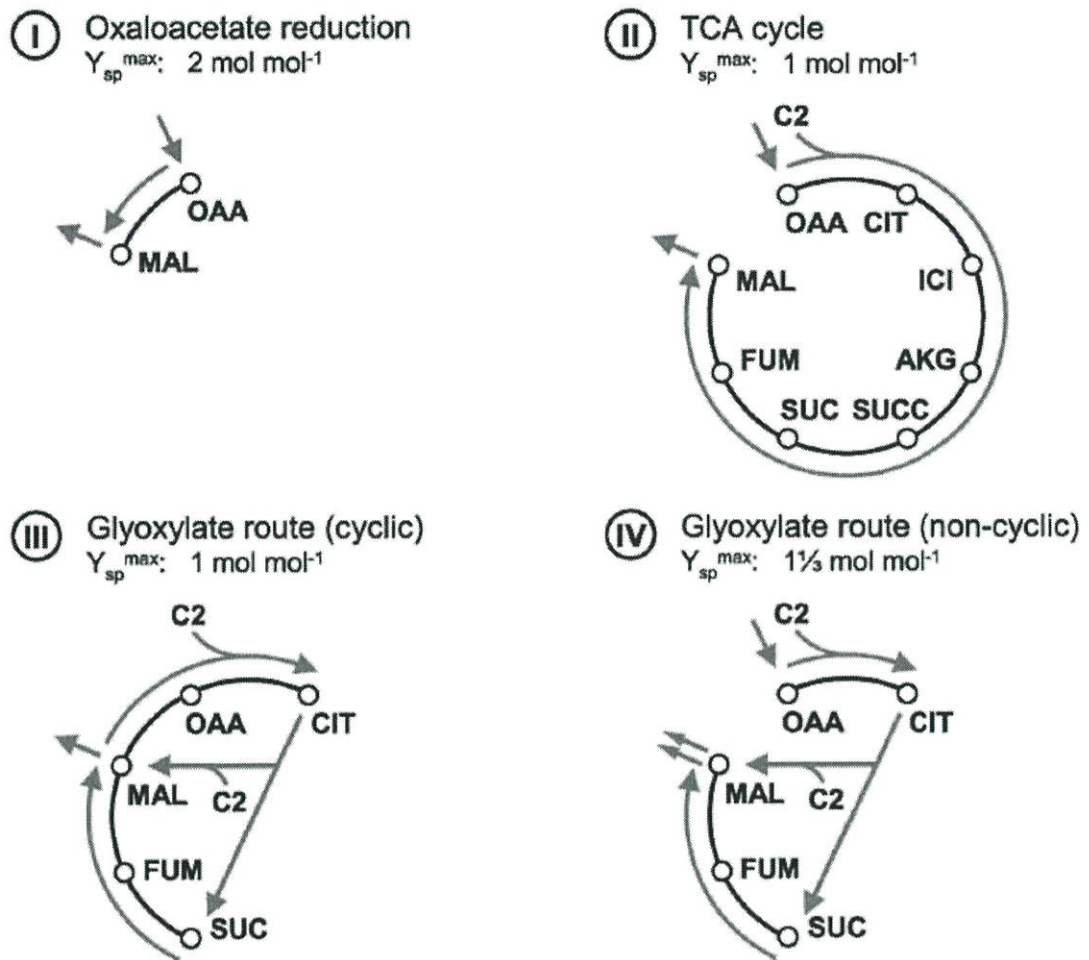
วิถีที่ 1 คือ วัฏจักรกรดซิตริกแบบผันกลับ เกิดการเปลี่ยนไพรูเวตเป็นออกซาโลแอซิเตตโดยเอนไซม์ไพรูเวตคาร์บอกซิเลส จากนั้นจะเปลี่ยนเป็นกรดมาลิกโดยเอนไซม์มาเลตดีไฮโดรจีเนส ซึ่งวิธีนี้จะมีอะดีโนซีนไตรฟอสเฟตเป็นสารตัวกลาง และมีการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์เข้ามารวมด้วย ได้ผลผลิตเป็นกรดมาลิกทางทฤษฎีสูงสุดที่ 2 โมล ต่อกลูโคส 1 โมล

วิถีที่ 2 คือ วัฏจักรกรดไตรคาร์บอกซิลิก เกิดคาร์บอนไดออกไซด์ 2 โมเลกุล ที่ถูกปล่อยออกมาผ่านทางปฏิกิริยาออกซิเดชันกรดซิตริกเป็นกรดมาลิก โดยจะได้ผลผลิตกรดมาลิก 1 โมล ต่อกลูโคส 1 โมล

วิถีที่ 3 คือ วัฏจักรไกลออกซีเลต ออกซาโลแอซิเตตถูกสร้างขึ้นมาใหม่โดยกรดมาลิก และจะได้ผลผลิตกรดมาลิก 1 โมล ต่อกลูโคส 1 โมล เพราะมีการปล่อยคาร์บอนไดออกไซด์ออกมาผ่านทางปฏิกิริยาการเปลี่ยนไพรูเวตเป็นอะซีติลโค เอ

วิถีที่ 4 คือ วัฏจักรไกลออกซีเลตแบบไม่เต็มวง เกิดออกซาโลแอซิเตตจากปฏิกิริยาไพรูเวตคาร์บอกซิเลสชันแล้วเข้าสู่วัฏจักร ได้ผลผลิตกรดมาลิก 1.33 โมล ต่อกลูโคส 1 โมล

ซึ่งเมื่อพิจารณาผลผลิตที่ได้ในแต่ละวิถี ดังรูปที่ 2.10 พบว่าวัฏจักรกรดไตรคาร์บอกซิลิกแบบผันกลับนั้นเหมาะสมที่จะใช้ในการออกแบบกระบวนการผลิตกรดมาลิกโดยเชื้อ *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* และ *Aspergillus oryzae* (Yin และคณะ, 2015)



รูปที่ 2.11 แสดงวัฏจักรกรดซิตริกแบบผันกลับ (Reverse tricarboxylic acid, rTCA) วัฏจักรกรดไตรคาร์บอกซิลิก (tricarboxylic acid cycle, TCA cycle) วัฏจักรไกลออกซีเลต (glyoxylate cycle) และวัฏจักรไกลออกซีเลตแบบไม่เต็มวง (noncyclic glyoxylate shunt) โดย OAA คือ ออกซาโลแอซิเตต (oxaloacetate), MAL คือ มาเลต (malate), C2 คือ อะซิติลโคเอ (acetyl-CoA), CIT คือ ซิเตรต (citrate), ICI คือ ไอโซซิเตรต (isocitrate), AKG คือ แอลฟา-คีโตกลูตาเลต (α -ketoglutarate), SUCC คือ ซัคซินิลโคเอ (succinyl-CoA), SUC คือ ซัคซิเนต (succinate), FUM คือ ฟูมาเรต (fumarate) และ Y_{sp}^{max} คือ ผลผลิตกรดมาลิกที่ได้สูงสุดทางทฤษฎีต่อการใช้กลูโคส (โมลต่อโมล)

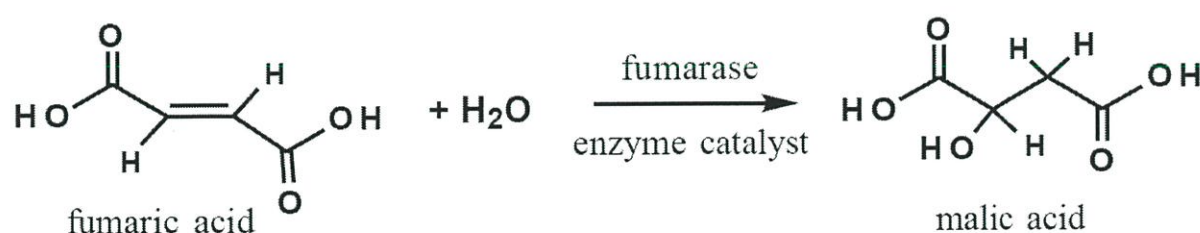
ที่มา : Zelle และคณะ (2008)

2.3.2 การผลิตกรดมาลิกจากการไฮโดรไลซิสกรดโพลีมาลิก

โดยปกติแล้วการหมักจุลินทรีย์สำหรับการผลิตกรดมาลิกโดยตรงนั้นจะถูกจำกัดการผลิต คือ มีปริมาณผลผลิตและอัตราการผลิตต่ำ เนื่องจากเกิดการยับยั้งจากผลิตภัณฑ์สุดท้าย (Zou และคณะ, 2013) ในปัจจุบันมีหลายงานวิจัยพยายามผลิตกรดมาลิกจากการไฮโดรไลซิสกรดโพลีมาลิกด้วยกรดแก่ (Zhang และคณะ, 2011; Zou และคณะ, 2013) ซึ่งในการหมักโดยเชื้อ *Aureobasidium pullulans* ได้กรดมาลิก 87.6 กรัมต่อลิตร จากการไฮโดรไลซิสกรดโพลีมาลิก 76.2 กรัมต่อลิตร มีอัตราการผลิต 0.61 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ส่วนการหมักแบบกะด้วยเซลล์ตรึงรูปในถังหมักแบบ fibrous-bed ให้ผลผลิตกรดมาลิกสูงสุด 144.2 กรัมต่อลิตร จากการไฮโดรไลซิสกรดโพลีมาลิก 123.7 กรัมต่อลิตร อัตราการผลิต 0.74 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง การไฮโดรไลซิสด้วยกรดถือเป็นทางเลือกหนึ่งที่สำคัญต่ออุตสาหกรรมการผลิตกรดมาลิกจากกลูโคสรวมถึงแหล่งคาร์บอนชนิดอื่น เนื่องจากในกระบวนการนี้ไม่มีการยับยั้งจากผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น (Zou และคณะ, 2013)

2.3.3 การผลิตกรดมาลิกโดยอาศัยเอนไซม์ฟูมาเรส

ในปฏิกิริยาการเปลี่ยนกรดฟูมาริกเป็นกรดมาลิกโดยเอนไซม์ฟูมาเรสนั้นเป็นปฏิกิริยาไฮเดรชัน (Hydration) แสดงดังรูปที่ 2.12 โดยโปรตอนจะเข้าไปจับกับโครงสร้างของกรดมาลิกในรูปของหมู่เมทิลีน (methylene group, CH₂) ซึ่งเป็นลักษณะจำเพาะของโครงสร้างสเตอริโอ เป็นการรวมตัวกันของปฏิกิริยาดิวเทอเรียมออกไซด์ (deuterium oxide) (Alberty และคณะ, 1957) โดยค่าคงที่สมดุลของเอนไซม์ฟูมาเรสจะขึ้นอยู่กับตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้ ส่วนค่าคงที่สมดุลของปฏิกิริยากรดมาลิกและกรดฟูมาริกจะเปลี่ยนแปลงไปตามชนิดของตัวทำละลายและ ค่าพีเอช, ไอออนโลหะ และแร่ธาตุของตัวทำละลายที่ต่างกัน (Liu และคณะ, 2015, 2017)



รูปที่ 2.12 แสดงปฏิกิริยาไฮเดรชันกรดฟูมาริกเป็นกรดมาลิก

ที่มา : Olsen และ Olsen (1991)

กระบวนการนี้เกิดขึ้นครั้งแรกเมื่อปี ค.ศ. 1974 โดยใช้เชื้อแบคทีเรีย *Brevibacterium ammoniages* ต่อมาในปี ค.ศ. 1977 ได้มีการเปลี่ยนมาใช้เชื้อแบคทีเรีย *B. flavum* เพราะให้ผลผลิตที่สูงกว่าประมาณร้อยละ 70 ของผลผลิตที่ได้ทางทฤษฎี โดยเอนไซม์ฟูมาเรสจะทำปฏิกิริยาที่ค่าพีเอชเป็นกลาง ได้ผลิตภัณฑ์ในรูปเกลือของกรดมาลิก ข้อเสียของวิธีนี้คือจะได้รับการดัดแปลงให้เป็นผล

พลอยได้ที่ไม่ต้องการ และจะไปยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ โดยการใช้ Bile extract กรดโคลิค (cholic acid) กรดดีออกซีโคลิค (deoxycholic acid) และ detergents ก็จะช่วยยับยั้งการผลิตกรดซัคซินิคได้ ทำให้ได้ผลผลิตกรดมาลิกเพิ่มสูงขึ้นคิดเป็นประมาณร้อยละ 80 - 86 ของผลได้ทางทฤษฎี (Hronska และคณะ, 2017) จุลินทรีย์ที่สามารถเปลี่ยนกรดฟูมาริกเป็นกรดมาลิกได้ เช่น *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae* และ *Saccharomyces bayanus* เป็นต้น

2.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดมาลิก

2.4.1 สายพันธุ์จุลินทรีย์

จุลินทรีย์แต่ละชนิดจะมีศักยภาพในการผลิตกรดมาลิกแตกต่างกัน โดยขึ้นอยู่กับวิถีเมแทบอลิซึมในเซลล์ของจุลินทรีย์นั้น ซึ่งจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตกรดมาลิกได้สูง ส่วนใหญ่จะอยู่ในกลุ่ม *Aspergillus* spp. และ *Penicillium* spp. (แสดงดังตารางที่ 2.1) ซึ่งโดยทั่วไปแล้วเชื้อราในกลุ่ม *Aspergillus* spp. เช่น *A. flavus*, *A. niger* และ *A. oryzae* จะผลิตกรดมาลิกจากวัฏจักรกรดซิตริกแบบผันกลับ (Reverse tricarboxylic acid, rTCA) ทำให้ได้ผลผลิตกรดมาลิกสูง แต่จุลินทรีย์กลุ่มนี้ไม่เหมาะที่จะนำมาผลิตกรดมาลิกสำหรับผลิตภัณฑ์อาหารและเครื่องดื่ม (Food grade chemicals) เพราะจะผลิตสารพิษไมโครทอกซิน (Microtoxin) ชนิดอะฟลาทอกซิน (Aflatoxin) ส่วนยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* จะแตกต่างจากเชื้อรา คือ 1. สามารถใช้ในโรงงานอุตสาหกรรมอาหารได้อย่างปลอดภัย 2. ทนต่อสภาวะที่มีปริมาณแหล่งคาร์บอนสูง 3. มีความไวต่อไอออนโลหะต่ำ 4. มีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยวสามารถควบคุมกระบวนการผลิตได้ดีกว่าเชื้อรา 5. มีความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนได้หลากหลาย แต่อย่างไรก็ตามจุลินทรีย์สายพันธุ์ธรรมชาติให้ปริมาณกรดมาลิก ผลได้ และอัตราการผลิตกรดมาลิกต่ำ จึงต้องมีการตัดแต่งพันธุกรรมเพื่อพัฒนาศักยภาพการผลิตกรดมาลิกโดยจุลินทรีย์ให้ดียิ่งขึ้น (Dai และคณะ, 2018) แสดงดังตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.1 แสดงผลผลิตกรดมาลิก อัตราการผลิตกรดมาลิก และค่าผลได้ที่ได้จากกระบวนการหมักน้ำตาลกลูโคสโดยจุลินทรีย์สายพันธุ์ธรรมชาติ

จุลินทรีย์	กรดมาลิก (กรัมต่อลิตร)	อัตราการผลิต (กรัมต่อลิตร ต่อชั่วโมง)	ผลได้ (กรัมต่อกรัม)	ที่มา
<i>Aspergillus flavus</i> ATCC 13697	113.00	0.59	0.94	Battat และคณะ (1991)
<i>A. oryzae</i> NRRL 3488	30.27	0.64	0.67	Knuf และคณะ (2013)
<i>A. oryzae</i> DSM 1863	58.16	0.16	0.51	Ochsenreither และคณะ (2014)
<i>Penicillium viticola</i> 152	131.00	1.36	1.00	Khan และคณะ (2014)
<i>P. sclerotiorum</i> K302	71.67	1.00	0.69	Wang และคณะ (2013)
<i>Schizophyllum commune</i> IFO 4928	18.00	0.16	0.36	Kawagoe และคณะ (1997)
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	74.90	0.21	0.39	Taing และ Taing (2007)
<i>Monascus araneosus</i>	27.90	0.23	0.37	Lumyong และ Tomita (1993)

ที่มา : Dai และคณะ (2018)

ตารางที่ 2.2 แสดงผลผลิตกรดมาลิก อัตราการผลิตกรดมาลิก และค่าผลได้ที่ได้จากกระบวนการหมักน้ำตาลกลูโคสโดยจุลินทรีย์ที่ดัดแต่งพันธุกรรม

จุลินทรีย์	กรดมาลิก (กรัมต่อลิตร)	อัตราการผลิต (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)	ผลได้ (กรัมต่อกรัม)	ที่มา
<i>Aspergillus oryzae</i> NRRL 3488	154.00	0.94	1.03	Brown และคณะ (2013)
<i>A. oryzae</i> NRRL 3488	165.00	1.38	0.68	Liu และคณะ (2017)
<i>A. oryzae</i> 2103a68	66.30	0.86	1.11	Knuf และคณะ (2014)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	59.00	0.19	0.31	Zelle และคณะ (2008)
<i>S. cerevisiae</i>	30.25	0.32	0.30	Chen และคณะ (2017)
<i>Pichia pastoris</i>	42.28	0.44	0.42	Zhang และคณะ (2015)
<i>Torulopsis glabrata</i>	8.50	0.18	0.14	Chen และคณะ (2013)
<i>Escherichia coli</i> WGS-10	9.25	0.74	0.42	Moon และคณะ (2008)
<i>E. coli</i> XZ658	34.00	0.47	1.06	Zhang และคณะ (2011)
<i>E. coli</i> W3110	21.65	0.30	0.36	Dong และคณะ (2017)
<i>E. coli</i>	0.35	0.12	1.09	Ye และคณะ (2013)
<i>E. coli</i>	36.05	0.58	0.55	Gao และคณะ (2017)
<i>Bacillus subtilis</i>	2.10	0.03	0.12	Mu และ Wen (2013)

ที่มา : Dai และคณะ (2018)

2.4.2 ชนิดของแหล่งคาร์บอน

น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่นิยมใช้ในการผลิตกรดอินทรีย์มากที่สุด เพราะสามารถใช้ในวิถีเมแทบอลิซึมสำหรับการผลิตกรดอินทรีย์ได้โดยตรง ส่วนน้ำตาลอื่น ๆ เช่น น้ำตาลไซโลสและน้ำตาลซูโครสนั้นจะให้ผลผลิตและอัตราการผลิตน้อยกว่าการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อทำการหมักภายใต้สภาวะเดียวกัน เนื่องจากจำเป็นจะต้องมีวิถีเมแทบอลิซึมอื่นในการเปลี่ยนน้ำตาลไซโลสและน้ำตาลซูโครส เข้าสู่วิถีไกลโคไลซิสและวัฏจักรกรดซิตริก และบางการทดลองได้มีการใช้แหล่งคาร์บอนที่ไม่ใช้น้ำตาลที่เป็นสารตั้งต้นในวิถีเมแทบอลิซึม เพื่อผลิตกรดอินทรีย์ที่ต้องการ เช่น กรดไพรวุคและกรดฟูมาริกสำหรับการผลิตกรดมาลิก (Abe และคณะ, 1962) ซึ่งการใช้น้ำตาลบริสุทธิ์เป็นแหล่งคาร์บอนนั้นจะทำให้ต้นทุนการผลิตสูง จึงได้มีการทดลองใช้วัสดุอื่นที่ราคาถูกแสดงดังตารางที่ 2.3 อาทิเช่น แป้งซึ่งมีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบเป็นแหล่งคาร์บอน รวมทั้งวัสดุลิกโนเซลลูโลสที่เป็นของเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมกระดาษและอุตสาหกรรมแปรรูปอาหาร ซึ่งการใช้วัสดุต้นทุนต่ำนี้จะต้องทำการปรับปรุงสภาพและการไฮโดรไลซิสด้วยวิธีทางกล กรด ต่าง และเอนไซม์ เพื่อให้ได้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวก่อนที่จะนำไปใช้เป็นอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ ซึ่งขั้นตอนการเตรียมแหล่งคาร์บอนนี้จะทำให้ต้นทุนการผลิตเพิ่มสูงขึ้น และมีการสร้างผลพลอยได้ที่เป็นพิษ หรือตัวยับยั้ง เช่น พีวแรน (polychlorinated dibenzo furans, PCDFs) และกรดอินทรีย์สายสั้น ๆ ที่อาจจะขัดขวางการเจริญเติบโตและวิถีเมแทบอลิซึมของจุลินทรีย์ ดังนั้นจึงต้องทำการกำจัดสารพิษก่อนนำไปใช้ในกระบวนการหมัก (Palmqvist และคณะ, 2000)

ตารางที่ 2.3 แสดงผลผลิตกรดมาลิกและค่าผลได้ที่ได้จากกระบวนการหมักจุลินทรีย์โดยใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ

แหล่งคาร์บอน	จุลินทรีย์	กรดมาลิก (กรัมต่อลิตร)	ผลได้ (กรัมต่อกรัม)	ที่มา
ซังข้าวโพด	<i>T. fusca</i> muC-16	21.5	0.43	Khan และคณะ (2014)
ฟางข้าวโพด	<i>R. delemar</i> HF-119	60.0	0.48	Li และคณะ (2014)
	<i>R. delemar</i> HF-121	121.8	0.97	
Thin stillage	<i>A. flavus</i> ATCC 13697	10.2	0.48	West และคณะ (2011)
	<i>A. niger</i> ATCC 9029	1.0	0.05	
	<i>A. niger</i> ATCC 9142	16.9	0.79	
	<i>A. niger</i> ATCC 10577	16.4	0.79	
กลีเซอรอลดิบ	<i>A. niger</i> ATCC 9142	16.5	0.17	West และคณะ (2015)
	<i>A. niger</i> ATCC 10577	20.3	0.20	
	<i>A. niger</i> ATCC 12846	23.5	0.24	
	<i>U. trichophora</i> TZ1	108.0	0.26	Zambanini และคณะ (2016)
ซินแก๊ส	<i>C. ljungdahli</i> DSM 13528/ <i>A. oryzae</i> DSM 1863	1.1	0.17	Oswald และคณะ (2016)
ไซโลส	<i>A. oryzae</i> DSM 1863	39.4	0.44	Ochsenreither และคณะ (2014)

ที่มา : West (2017)

2.4.3 อัตราส่วนระหว่างแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจน (C/N ratio)

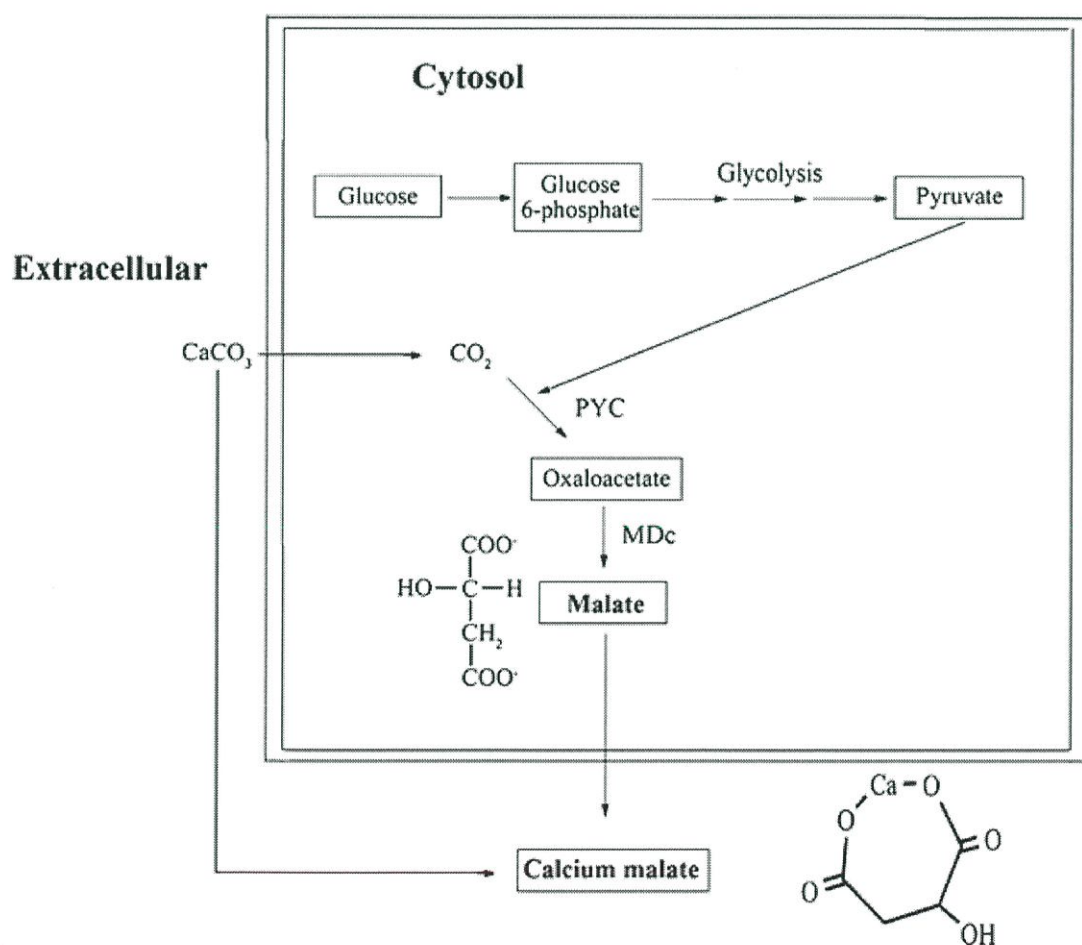
ในส่วนขององค์ประกอบอาหาร เมื่อมีอัตราส่วนระหว่างแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจนสูง (มีแหล่งคาร์บอนมากเกินไปและมีแหล่งไนโตรเจนอย่างจำกัด) ในอาหารเพาะเลี้ยงนั้น พบว่ามีผลทำให้เกิดการผลิตมากเกินไป (overproduction) และทำให้เกิดการสะสมกรดไดคาร์บอกซิลิกภายในวิถีเมแทบอลิซึมที่เกี่ยวข้องกับวัฏจักรกรดซิตริก (Goldberg และคณะ, 2006) เซลล์มีการเจริญเติบโตได้เพียงจำนวนหนึ่งแล้วจะหยุดการเพิ่มจำนวนเซลล์ เนื่องจากมีปริมาณแหล่งไนโตรเจนที่จำกัด จึงต้องการสังเคราะห์สารที่เกี่ยวข้องกับเซลล์ ซึ่งในจุลินทรีย์บางสายพันธุ์จะตอบสนองต่อความเครียดนี้ด้วยการเบี่ยงเอาปริมาณแหล่งคาร์บอนที่มากเกินไปไปผลิตกรดอินทรีย์ แต่หากมีอัตราส่วนระหว่างแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจนสูงมากเกินไป จะทำให้เกิดการยับยั้งโดยสารตั้งต้น (substrate inhibition) โดยเซลล์จะสูญเสียประสิทธิภาพในการผลิตและการดำรงชีวิตอยู่ตลอดจนสิ้นสุดกระบวนการหมัก (Mondala, 2015)

2.4.4 แร่ธาตุและวิตามิน

การเติมไอออนโลหะและวิตามินในอาหารสำหรับกระบวนการหมักนั้นเป็นประโยชน์ต่อการเจริญเติบโตและวิถีเมแทบอลิซึม ไอออนโลหะ เช่น Mg^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} และ Mn^{2+} และวิตามิน เช่น ไบโอติน (biotin) และไรโบฟลาวิน (riboflavin) จะถูกใช้เป็นตัวโคแฟกเตอร์หรือตัวกระตุ้นสำหรับเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในวิถีเมแทบอลิซึมและแคแทบอลิซึม เช่น วัฏจักรกรดซิตริก โดยเฉพาะ Mg^{2+} และ Mn^{2+} จะช่วยในการจับกันของสารตั้งต้นและรักษาเสถียรภาพของปฏิกิริยาการเปลี่ยนไอโซไซเตรตเป็นแอลฟา-คีโตกลูตาเลตโดยไอโซไซเตรตดีไฮโดรจีเนส ส่วนไบโอตินเป็นตัวกระตุ้นของเอนไซม์ไพรุเวตคาร์บอกซิเลส ช่วยให้ไพรุเวตตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ในวัฏจักรกรดซิตริกที่เกิดขึ้นในไซโตซอลสำหรับการผลิตกรดฟูมาริกและกรดมาลิก อย่างไรก็ตามการเติมวิตามินในอาหารสำหรับการหมักนั้นไม่เป็นที่นิยมทำกัน เนื่องจากมีราคาแพง ซึ่งวิตามินเหล่านี้จะมีในน้ำหมักข้าวโพด (corn steep liquor) และยีสต์สกัด จึงอาจใช้สารอาหารเหล่านี้ทดแทนได้ (Mondala, 2015)

2.4.5 สารปรับสภาพค่าพีเอชให้เป็นกลาง (Neutralizing agents)

ในกระบวนการผลิตกรดมาลิกนั้นจำเป็นต้องมีการเติมสารที่ทำให้ค่าพีเอชของน้ำเลี้ยงเป็นกลาง เพื่อรักษาค่าพีเอชให้ได้ประมาณ 6.0 โดยสารนี้จะทำให้ได้ผลิตภัณฑ์อยู่ในรูปของเกลือมาเลต เนื่องจากปริมาณกรดมาลิกที่ถูกผลิตเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ นั้น จะส่งผลให้ค่าพีเอชของน้ำหมักลดลง เกิดการแพร่ของกรดอิสระกลับเข้าสู่เซลล์ผ่านทางเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้ค่าพีเอชภายในเซลล์ลดลง แล้วไปยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์มาเลต โดยสารที่ทำให้ค่าพีเอชเป็นกลาง เช่น โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) โซเดียมไบคาร์บอเนต (NaHCO_3) แคลเซียมคาร์บอเนต ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) แคลเซียมไฮดรอกไซด์ (CaCO_3) และแอมโมเนียมคาร์บอเนต ($(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$) ซึ่งแคลเซียมคาร์บอเนต เป็นสารที่นิยมใช้เป็นอย่างมาก เนื่องจากในระหว่างการเกิดปฏิกิริยาสะเทิน (Neutralization Reaction) จะเกิดการปล่อยคาร์บอนไดออกไซด์ออกมา แสดงดังรูปที่ 2.13 ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อวิถีเมแทบอลิซึม (Mondala, 2015)



รูปที่ 2.13 แสดงการใช้แคลเซียมคาร์บอเนตเป็นสารปรับสภาพค่าพีเอชให้เป็นกลางและกระบวนการผลิตกรดมาลิกที่ได้ผลิตภัณฑ์อยู่ในรูปแคลเซียมมาเลต

ที่มา : Khan และคณะ (2014)

2.5 การประยุกต์ใช้กรดมาลิก

2.5.1 อุตสาหกรรมการผลิตเครื่องสำอางค์

กรดมาลิกเป็นกรดผลไม้ที่เรียกว่า กรดแอลฟาไฮดรอกซี (AHAs) ซึ่งแอลฟาไฮดรอกซีจะกระตุ้นการผลิตเซลล์ผิวทำให้ผิวที่หมองคล้ำจะถูกเอาออกเพื่อเปิดทางให้ผิวเกิดใหม่ (Van Scott และ Yu, 1984) โดยผลิตภัณฑ์ดูแลผิวที่มีกรดมาลิกเป็นส่วนผสมสามารถให้ประโยชน์หลากหลาย เช่น ทำให้ผิวชุ่มชื้น ช่วยขจัดเซลล์ผิวที่ตายแล้ว ทำให้ผิวเรียบเนียน สิวสม่ำเสมอ และลดริ้วรอย เป็นต้น กรดมาลิกยังเป็นสารฮิวเมกเตนซ์ ซึ่งเป็นสารที่ช่วยกักเก็บความชุ่มชื้นสามารถช่วยให้ผิวมีความชุ่มชื้น (Wenninger และ McEwen, 1997) ปัจจุบันมักใช้กรดมาลิกเป็นส่วนผสมในเครื่องสำอางค์เพื่อรักษาความสมดุลของค่าพีเอช โดยกรดมาลิกจะสามารถรักษาความสมดุลของพีเอชมากกว่ากรดผลไม้อื่น ๆ เช่น กรดซิตริกและกรดแลคติก เป็นต้น

2.5.2 อุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม

ในอุตสาหกรรมอาหารมักใช้กรดมาลิกเป็นสาร acidulant เพื่อเพิ่มความเป็นกรดของผลิตภัณฑ์อาหาร การเพิ่มความเป็นกรดของอาหารจะช่วยในการดูแลรักษา การเพิ่มประสิทธิภาพรสชาติ เป็นต้น โดยการใช้กรดสองชนิดหรือมากกว่าร่วมกันเพื่อผลิตรสชาติที่เป็นเอกลักษณ์ เช่น กรดซิตริก กรดมาลิก และกรดทาร์ทาริก เป็นสารเติมแต่งที่ใช้กันทั่วไปในอุตสาหกรรมอาหาร ซึ่งได้มาจากผลไม้ (ส้ม แอปเปิ้ล องุ่น และมะขาม เป็นต้น) โดยผ่านการสกัดและการหมักด้วยเทคนิคต่าง ๆ ดังนั้นสามารถใช้ได้อย่างง่ายดายและสะดวกสบายสำหรับอุตสาหกรรมอาหาร โดยความเป็นกรดจะทำหน้าที่เป็นสารกันบูด โดยกรดมาลิกมักไม่ได้ใช้ในการผลิตผลิตภัณฑ์อาหาร แต่ถูกใช้เป็นสารเพิ่มความเป็นกรดในอาหารโดยตรง (acidulant) และยังสามารถใช้เพิ่มรสชาติของอาหารได้อีกด้วย (Mondala, 2015; Chi และคณะ, 2016)

2.5.3 อุตสาหกรรมโพลีเมอร์

กรดมาลิกสามารถใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตกรดโพลีมาลิก ซึ่งกรดโพลีมาลิกจะถูกนำไปใช้ในอุตสาหกรรมยา โดยใช้เป็นสารเคลือบตัวยาและนำไปสู่บริเวณเป้าหมายในร่างกาย (Huang และคณะ, 2012) ส่วนอนุพันธ์ของกรดโพลีมาลิกมีคุณสมบัติที่ไม่ละลายน้ำสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมเคลือบหรือเป็น micro particles และ nanoparticles เป็นต้น (Vert, 1998) นอกจากนี้กรดมาลิกยังสามารถใช้ในอุตสาหกรรมผลิตพลาสติกย่อยสลายได้และเป็นสารเคมีที่ใช้ในการทำควาสะอาดโลหะต่าง ๆ เป็นต้น (Liu และ Steinbuchel, 1996)

2.6 กากน้ำตาลจากอ้อย

กากน้ำตาลจากอ้อยเป็นผลพลอยได้จากโรงงานผลิตน้ำตาล ซึ่งเป็นของเสียที่ได้จากน้ำทิ้งสุดท้ายที่เกิดจากกระบวนการผลิตน้ำตาลซูโครส ที่ผ่านการระเหยน้ำออก การตกผลึก และการปั่นเหวี่ยงน้ำอ้อย กากน้ำตาลประกอบด้วยน้ำตาลปริมาณสูง แร่ธาตุ สารประกอบอินทรีย์และวิตามินที่เป็นสารอาหารที่สำคัญต่อกระบวนการหมัก และโลหะหนัก เช่น ทองแดง เหล็ก แมงกานีส สังกะสี ตะกั่ว แคดเมียม และนิกเกิล เป็นต้น แสดงดังตารางที่ 2.4 โดยชนิดและปริมาณของโลหะหนักในกากน้ำตาลของแต่ละโรงงานจะแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของอ้อย การเปลี่ยนแปลงของระบบนิเวศในดิน ปุ๋ยและน้ำที่ใช้ในการเพาะปลูกอ้อย สารเติมแต่งในระหว่างกระบวนการผลิตน้ำตาลจากน้ำอ้อย และการกักกรองภาชนะที่บรรจุที่เกิดจากคาร์บอนไดออกไซด์และซัลเฟอร์ไดออกไซด์ ซึ่งกากน้ำตาลมีสารยับยั้ง เช่น 5-ไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรัล (5-hydroxymethylfurfural, 5-HMF) และไอออนโลหะหนัก ที่ไปกีดขวางวิถีเมแทบอลิซึมของเซลล์ ดังนั้นก่อนนำกากน้ำตาลไปใช้ในกระบวนการหมักจึงจำเป็นต้องทำการปรับสภาพเพื่อลดปริมาณสารยับยั้ง (Abdel-Rahman และคณะ, 2016)

2.6.1 กระบวนการปรับสภาพกากน้ำตาล

2.6.1.1 การตกตะกอนทางเคมี

เป็นกระบวนการที่นิยมใช้กันเป็นจำนวนมากในโรงงานอุตสาหกรรม เพราะเป็นวิธีที่ง่ายและมีค่าใช้จ่ายต่ำ เป็นการทำให้เกิดตะกอนโดยการทำปฏิกิริยาเคมีกับไอออนโลหะหนักเกิดเป็นตะกอนที่ไม่ละลายน้ำ ซึ่งสามารถทำการแยกตะกอนนี้ออกจากสารละลายได้ด้วยการทำให้ตกตะกอนและการกรอง ซึ่งการตกตะกอนทางเคมีนี้มีอยู่สองวิธีคือ การตกตะกอนร่วมกับไฮดรอกไซด์ (Hydroxide precipitation) และการตกตะกอนร่วมกับซัลไฟด์ (Sulfide precipitation) (Fu และ Wang, 2011)

2.6.1.1.1 การตกตะกอนร่วมกับไฮดรอกไซด์

ความสามารถในการละลายของโลหะไฮดรอกไซด์จะลดน้อยลงในช่วงค่าพีเอช 8.0 – 11.0 ซึ่งสามารถกำจัดโลหะไฮดรอกไซด์นี้ได้ด้วยวิธีการทำให้เกิดการจับกันเป็นกลุ่มแล้วตกตะกอนโดยใช้สารเคมี เช่น แคลเซียมไฮดรอกไซด์และโซเดียมไฮดรอกไซด์ ร่วมกับสารที่ทำให้เกิดการจับกันเป็นกลุ่มก้อน เช่น สารส้ม เกลือของเหล็ก และโพลีเมอร์อินทรีย์ ซึ่งพบว่าค่าพีเอชที่เหมาะสม คือค่าพีเอชที่สูงกว่า 9.5 และที่ค่าพีเอชเท่ากับ 12.0 จะทำให้เกิดการตกตะกอนของทองแดงได้สูงสุด ข้อจำกัดของวิธีนี้คือ 1. ทำให้เกิดตะกอนที่มีความหนาแน่นต่ำยากแก่การกำจัดออก 2. โลหะไฮดรอกไซด์บางชนิดมีคุณสมบัติเป็นแอมโฟเทอริก ทำให้มีค่าพีเอชที่ไม่แน่นอน อาจทำให้โลหะอื่นกลับมาละลายในสารละลายได้อีกครั้ง 3. เมื่อเกิดการจับกันเป็นสารประกอบแล้วจะไปยับยั้งการตกตะกอนของโลหะไฮดรอกไซด์ (Fu และ Wang, 2011)

2.6.1.1.2 การตกตะกอนร่วมกับซัลไฟด์

เป็นวิธีการกำจัดโลหะที่ค่าพีเอชต่ำ (พีเอชต่ำกว่า 3.0) และได้ผลอย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งข้อดีของการใช้ซัลไฟด์ เช่น กรดซัลฟูริก คือตะกอนโลหะซัลไฟด์มีความสามารถในการละลายต่ำกว่าตะกอนของโลหะไฮดรอกไซด์ และตะกอนโลหะซัลไฟด์ไม่มีคุณสมบัติเป็นแอมโฟเทอริก และด้วยสาเหตุนี้จึงทำให้กระบวนการตกตะกอนร่วมกับซัลไฟด์สามารถกำจัดโลหะได้ในระดับที่มากกว่าการตกตะกอนร่วมกับไฮดรอกไซด์ เพราะมีช่วงค่าพีเอชที่ครอบคลุมกว่า แต่โลหะสามารถแตกตัวได้ในสภาวะที่เป็นกรด ดังนั้นอาจทำให้ตะกอนซัลไฟด์เกิดเป็นสารพิษไฮโดรเจนซัลไฟด์ฟุ้ง (Fu และ Wang, 2011) นอกจากการเติมสารละลายกรดซัลฟูริกจะเป็นการทำให้เกิดการตกตะกอนของโลหะหนักแล้ว ยังเป็นการไฮโดรไลซิสน้ำตาลซูโครสในกากน้ำตาลที่เป็นโมเลกุลคู่ให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวด้วย (กลูโคสและฟรุกโตส) โดยทำการปรับค่าพีเอชให้เท่ากับ 3 ในบางกรณีอาจจะปรับค่าพีเอชของสารละลายกากน้ำตาลเท่ากับ 1 เพื่อให้ซูโครสถูกย่อยจนหมด (Hofman และ Thonart, 2001)

2.6.1.1.3 การตกตะกอนทางเคมีด้วยการคีเลชันโลหะหนัก

สารที่นิยมใช้ในการตกตะกอนโลหะหนักด้วยวิธีนี้ คือ ไตรเมอร์แคปโตไตรเอซีน (Trimercaptotriazine) โพแทสเซียม/โซเดียมไธโอคาร์บอเนต (Potassium/Sodiumthiocarbonate) และโซเดียมไธโอคาร์บาเมต (Sodiumdimethyldithiocarbamate) (Fu และ Wang, 2011)

2.6.1.2 การแลกเปลี่ยนไอออน

เรซินที่ใช้ทั้งเรซินสังเคราะห์และเรซินธรรมชาติต่างก็มีความจำเพาะต่อการแลกเปลี่ยนไอออนบวกของโลหะหนัก แต่เรซินสังเคราะห์จะมีประสิทธิภาพดีกว่า สามารถกำจัดโลหะหนักในสารละลายได้เกือบหมด เรซินธรรมชาติที่นิยมใช้ส่วนใหญ่คือซีโอไลต์และแรชิลิกेटเพราะหาได้ง่ายและมีราคาถูก ตัวแลกเปลี่ยนไอออนบวกโดยทั่วไปจะเป็นเรซินชนิดกรดแก่จำพวกกลุ่มกรดซัลโฟนิก ($-SO_3H$) และเรซินชนิดกรดอ่อนจำพวกกลุ่มกรดคาร์บอกซิลิก ($-COOH$) ซึ่งไฮโดรเจนไอออนในกลุ่มซัลโฟนิกและกลุ่มคาร์บอกซิลิกจะทำหน้าที่เป็นตัวแลกเปลี่ยนไอออนกับไอออนบวกของโลหะ เมื่อสารละลายที่มีโลหะหนักเป็นส่วนประกอบเคลื่อนที่ผ่านเข้าสู่คอลัมน์ เกิดการแลกเปลี่ยนไอออนระหว่างโลหะไอออนกับไฮโดรเจนไอออนบนเรซิน โดยความสามารถในการดูดซับโลหะไอออนโดยเรซินแลกเปลี่ยนไอออนจะขึ้นอยู่กับ ค่าพีเอช อุณหภูมิ ความเข้มข้นของโลหะเริ่มต้น และเวลาที่ใช้ ทั้งนี้ประจุของไอออนก็มีผลต่อการแลกเปลี่ยนไอออนด้วย (Fu และ Wang, 2011)

2.6.1.3 การดูดซับ

2.6.1.3.1 การดูดซับด้วยถ่านกัมมันต์

ในปัจจุบันแหล่งผลิตถ่านกัมมันต์มีลดน้อยลงทำให้ราคาของถ่านกัมมันต์เพิ่มสูงขึ้น เพื่อลดต้นทุนการผลิตจึงมีการเติมสารเติมแต่งหรือสารประกอบอื่นร่วมด้วย เช่น อาร์จินีน (Park และคณะ, 2007) กรดแทนนิก (Üçer และคณะ, 2006) แมกนีเซียม (Yanagisawa และคณะ, 2010) และสารลดแรงตึงผิว (Ahn และคณะ, 2009) ซึ่งถ่านชีวภาพสามารถดูดซับโลหะหนักได้ดีกว่าถ่านจากถ่านหินและถ่านจากกะลามะพร้าว (Fu และ Wang, 2011)

2.6.1.3.2 การดูดซับด้วยท่อนาโนคาร์บอน (Carbon nanotubes, CNTs)

ท่อนาโนคาร์บอนถูกค้นพบโดย Iijima ในปี ค.ศ. 1991 มี 2 ชนิด คือท่อนาโนคาร์บอนผนังเดี่ยว (Single-walled carbon nanotubes, SWCNTs) และท่อนาโนคาร์บอนผนังหลายชั้น (Multi-walled carbon nanotubes, MWCNTs) (Odom และคณะ, 1998) โดยหลักการดูดซับของท่อนาโนคาร์บอนมีความซับซ้อนเป็นอย่างมาก ทั้งแรงดึงดูดไฟฟ้าสถิตย์ การตกตะกอนร่วม (Sorption-precipitation) และปฏิกิริยาเคมีระหว่างโลหะไอออนกับหมู่ฟังก์ชันบนพื้นผิวท่อนาโนคาร์บอน (Rao และคณะ, 2007) ท่อนาโนคาร์บอนมีความสามารถในการดูดซับโลหะไอออนต่ำ ทำให้ต้องมีการปรับสภาพพื้นผิวท่อนาโนคาร์บอนด้วยการออกซิไดซ์ด้วยสารละลายกรดไนตริก (Nitric acid, HNO_3) โซเดียมไฮโปคลอไรต์ (Sodium hypochlorite, NaClO) และโพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนต (Potassium permanganate, KMnO_4) เพื่อให้มีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้น (Fu และ Wang, 2011)

2.6.1.4 การกรองผ่านเยื่อเลือกผ่าน

2.6.1.4.1 อัลตราฟิลเตรชัน (Ultrafiltration, UF)

เป็นกระบวนการกรองโดยใช้แรงดันต่ำ โดยขนาดรูพรุนของเยื่อเลือกผ่านอัลตราฟิลเตรชันจะใหญ่กว่าโลหะไอออนที่ละลายอยู่ในรูปของไฮเดรตไอออน หรือสารประกอบที่มีมวลโมเลกุลต่ำ ทำให้ไอออนสามารถเคลื่อนที่ผ่านเยื่อเลือกผ่านอัลตราฟิลเตรชันได้อย่างง่ายดาย ดังนั้นจึงควรเลือกใช้กระบวนการกรองแบบ Micellar enhanced ultrafiltration (MEUF) และ Polymer enhanced ultrafiltration (PEUF) เพื่อให้สามารถกำจัดโลหะไอออนได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Fu และ Wang, 2011)

MEUF คือ เทคนิคการแยกโดยการเติมสารลดแรงตึงผิวลงไปในสารละลายจนถึงจุด Critical micelle concentration (CMC) คือความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวในสารละลายมีมากพอที่จะทำให้โมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวเกิดการรวมตัวกันเป็นไมเซลล์ เมื่อเป็นไมเซลล์แล้วก็จะสามารถจับกับโลหะไอออนได้ กลายเป็นสารประกอบขนาดใหญ่ที่ไม่สามารถเคลื่อนที่ผ่านเยื่อเลือกผ่านอัลตราฟิลเตรชันที่มีขนาดรูพรุนเล็กกว่าได้ สารลดแรงตึงผิวที่นิยมใช้คือ โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต

(Sodium dodecyl sulfate, SDS) เพราะมีประจุลบทำให้มีประสิทธิภาพในการกำจัดโลหะไอออนเพิ่มขึ้น โดยความสามารถในการกำจัดโลหะไอออนด้วยวิธีนี้ขึ้นอยู่กับ ความเข้มข้นของโลหะและสารลดแรงตึงผิว ค่าพีเอชของสารละลาย ความแรงของไอออน และค่าพารามิเตอร์ที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของเยื่อเลือกผ่าน (Fu และ Wang, 2011)

PEUF คือเทคนิคการแยกโดยใช้โพลีเมอร์ที่สามารถละลายน้ำได้เช่น กรดโพลีอะคริลิก (Polyacrylic acid, PAA) โพลีเอทิลีนไอมิน (Polyethyleneimine, PEI) ไดเอทิลามิโนเอทิลเซลลูโลส(Diethylaminoethyl cellulose, DEAE-C) และกรดฮิวมิก (Humic acid) เข้าไปจับกับโลหะไอออนกลายเป็นสารประกอบขนาดใหญ่ที่มีมวลโมเลกุลสูง แล้วจะถูกเยื่อเลือกผ่านกักไว้ได้เมื่อเอาส่วนรีเทนเทท (Retentate) มาแยกเอาโลหะไอออนออกก็จะได้โพลีเมอร์ที่สามารถเอามากลับมาใช้ซ้ำได้อีก โดยความสามารถในการกำจัดโลหะไอออนด้วยวิธีนี้ขึ้นอยู่กับ ชนิดของโพลีเมอร์ อัตราส่วนของโลหะไอออนต่อโพลีเมอร์ และค่าพีเอชของสารละลาย (Fu และ Wang, 2011)

ตารางที่ 2.4 ส่วนประกอบของกากน้ำตาลจากอ้อยในประเทศต่าง ๆ

ส่วนประกอบ (ร้อยละโดยมวลต่อมวล)	ประเทศ			
	บราซิล	อิหร่าน	ญี่ปุ่น	จีน
ของแข็งทั้งหมด	70.4	-	81.15	-
บริกซ์	-	84.60	89.76	85.60
ความบริสุทธิ์	-	32.27	39.14	62.80
แป้ง	-	0.10	-	-
น้ำตาลทั้งหมด	46.9	-	48.87	53.90
ซูโครส	33.6	33.11	31.76	33.90
น้ำตาลอินเวิร์ท	11.6	-	15.44	20.00
โปรตีน	3.2	-	-	-
ไนโตรเจนทั้งหมด	-	0.20	0.90	0.49
ถั่ว	-	11.82	13.82	10.30
ไดฟอสฟอรัส เพนตะออกไซด์	-	0.09	0.07	0.13
แคลเซียม	6.67×10^{-3}	1.22	0.78	-
กำมะถัน	5.23×10^{-3}	-	-	-
แมกนีเซียม	4.7×10^{-3}	0.66	1.84	-
โพแทสเซียม	1.75×10^{-3}	6.10	-	-
ฟอสฟอรัส	0.21×10^{-3}	-	-	-
เหล็ก	0.12×10^{-3}	-	0.03	-
แมงกานีส	0.03×10^{-3}	-	-	-
สังกะสี	0.03×10^{-4}	-	-	-
โคบอลต์	$<0.05 \times 10^{-5}$	-	-	-
โซเดียม	-	0.11	-	-
ซิลิคอน	-	0.36	0.28	-
คลอไรด์	-	1.96	-	-
ซัลเฟต	-	2.50	3.36	-
ที่มา	Papadaki และคณะ (2017)	Torkashvnad และคณะ (2009)	Hashizume และคณะ (1966)	Li และคณะ (2015)

2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.7.1 การผลิตกรดซัคซินิกจากกากน้ำตาลจากอ้อยโดย *Actinobacillus succinogenes* (Liu และคณะ, 2008)

Liu และคณะ (2008) ได้ทำการผลิตกรดซัคซินิกโดยกระบวนการหมัก *Actinobacillus succinogenes* CGMCC1593 ในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกากน้ำตาลจากอ้อยในขวดที่สภาวะไม่มีอากาศ พบว่าช่วงเวลาที่ 60 อาหารที่ใช้กากน้ำตาลที่ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกเป็นแหล่งคาร์บอน ให้ผลผลิตกรดซัคซินิกได้สูงสุด เท่ากับ 50.1 กรัมต่อลิตร คิดเป็นค่าผลได้ เท่ากับร้อยละ 80.5 และน้ำตาลถูกใช้ไปร้อยละ 95.6 แสดงดังตารางที่ 2.5 และเมื่อทำการเพาะเลี้ยงในถังหมักแบบกะ พบว่าช่วงเวลาที่ 48 ได้ผลผลิตกรดซัคซินิก 46.4 กรัมต่อลิตร แสดงว่าเชื้อสามารถเจริญเติบโตในถังหมักได้เร็วกว่าการเพาะเลี้ยงในขวด

ตารางที่ 2.5 แสดงผลผลิตกรดซัคซินิกจากการเพาะเลี้ยง *A. succinogenes* โดยใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนในขวดที่สภาวะไม่มีอากาศ

วิธีการปรับสภาพ	กรดซัคซินิก (กรัมต่อลิตร)	ผลได้ (ร้อยละ)	ปริมาณน้ำตาลที่ใช้ (ร้อยละ)
ไม่ปรับสภาพ	44.2 ± 1.0	85.3 ± 1.0	79.7 ± 1.9
ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริก	50.1 ± 0.8	80.5 ± 1.4	95.6 ± 0.9
ปรับสภาพด้วยโพแทสเซียม เพอร์โรไซยานด์	45.2 ± 1.5	78.6 ± 2.7	88.5 ± 1.6
ปรับสภาพด้วยถ่านกัมมันต์	45.7 ± 0.9	80.2 ± 1.6	87.7 ± 1.3
ปรับสภาพโดยใช้เรซินเป็นตัวดูดซับ	43.4 ± 1.4	78.5 ± 2.4	85.1 ± 1.2
ปรับสภาพโดยใช้เรซินแลกเปลี่ยนไอออนชนิดแคทไอออน	49.6 ± 1.2	80.0 ± 2.0	95.4 ± 0.6

นอกจากนี้ Liu และคณะ (2008) ได้ศึกษาผลของปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นต่อการเจริญเติบโตและการผลิตสารเมแทบอลิต์ของเซลล์ โดยใช้ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นในกากน้ำตาลที่ความเข้มข้น 35, 50, 65, 80 และ 100 กรัมต่อลิตร พบว่าปริมาณกรดซัคซินิกที่ผลิตได้จะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น สังเกตได้จากช่วงความเข้มข้นที่ 35 – 65 กรัมต่อลิตร โดยที่ความเข้มข้น 65 กรัมต่อลิตรนั้นให้ผลผลิตกรดซัคซินิกได้สูงที่สุดคือ 50.6 กรัมต่อลิตร คิดเป็นผลได้ร้อยละ 79.5 และมีใช้น้ำตาลไปร้อยละ 97.1 ในขณะที่ความเข้มข้นมากกว่า 65 กรัมต่อลิตร กลับมีปริมาณชีวมวลกรดซัคซินิก และปริมาณน้ำตาลที่ใช้ลดลง ซึ่งอาจมีสาเหตุเนื่องจากปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นใน

กากน้ำตาลที่สูงเกินไปยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์และการผลิตกรดซัคซินิก ซึ่งเป็นการยับยั้งโดยซีสเตรท พบได้บ่อยในกระบวนการหมักแบบกะ และทำการศึกษาระดับปริมาณยีสต์สกัดที่เหมาะสมต่อการผลิต กรดซัคซินิก ที่ความเข้มข้น 0, 5, 10, 15 และ 20 กรัมต่อลิตร พบว่าความเข้มข้นของเซลล์จะเพิ่มขึ้นตามปริมาณของยีสต์สกัด ในขณะที่ปริมาณกรดซัคซินิกจะลดลงเพียงเล็กน้อย

และ Liu และคณะ (2008) ยังได้ทำการวิเคราะห์ราคาต้นทุนการผลิตโดยใช้กากน้ำตาลเทียบกับกลูโคสต่อผลผลิตกรดซัคซินิกที่ได้อ้อยละ 80 จากราคาวัตถุดิบเท่ากับ 0.10 และ 0.39 ดอลลาร์สหรัฐต่อกิโลกรัม ค่ากระบวนการผลิตเท่ากับ 0.25 และ 0.49 ดอลลาร์สหรัฐต่อกิโลกรัม รวมกับค่ากระบวนการทำให้บริสุทธิ์ที่คิดเป็นประมาณร้อยละ 60-70 ของราคาผลิตภัณฑ์แล้วสรุปได้ว่า ต้นทุนการผลิตทั้งหมดเท่ากับ 0.44 และ 0.82 ดอลลาร์สหรัฐต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ซึ่งเห็นได้ชัดว่ากระบวนการผลิตกรดซัคซินิกโดยใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนนั้นมีต้นทุนการผลิตต่ำกว่าการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน

2.7.2 ความสามารถในการผลิตกรดแลคติกโดยใช้อาหารที่มีแหล่งคาร์บอนเป็น

กากน้ำตาลร่วมกับน้ำตาลกลูโคส (Xu และ Xu, 2014)

Xu และ Xu (2014) ได้ทำการศึกษามูลของการใช้น้ำตาลในกากน้ำตาลจากอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอนในกระบวนการผลิตกรดแลคติก โดยทำการหมัก *Bacillus coagulans* ในอาหารปริมาตร 30 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบไปด้วย ยีสต์สกัด 10 กรัมต่อลิตร เปปโตนถั่วเหลือง 5 กรัมต่อลิตร และแคลเซียมคาร์บอเนต 20 กรัมต่อลิตร โดยมีแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกันคือน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร น้ำตาลฟรุกโตส 7.2 กรัมต่อลิตร และกากน้ำตาลจากอ้อยโดยให้มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 100 กรัมต่อลิตร ทำการเพาะเลี้ยงในพลาสติกขนาด 100 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 52 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ได้ผลผลิตกรดแลคติก 24.8, 6.9 และ 34.5 กรัมต่อลิตร และมีอัตราการผลิต 1.0, 0.29 และ 1.4 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ ซึ่งพบว่าเมื่อใช้กากน้ำตาลจากอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอนมีอัตราการใช้แหล่งคาร์บอนสูงที่สุด โดยในกากน้ำตาลจากอ้อยมีปริมาณแหล่งไนโตรเจนร้อยละ 0.5 โดยมวลต่อปริมาตร ซึ่งเป็นสารอาหารที่สำคัญต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ ส่งผลให้อัตราการผลิตกรดแลคติกเพิ่มสูงขึ้น

นอกจากนี้ Xu และ Xu (2014) ได้ทำการศึกษามูลของกากน้ำตาลจากอ้อยต่อกระบวนการหมักกรดแลคติกในอาหารที่มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมด 250 กรัมต่อลิตร จากแหล่งคาร์บอนผสมระหว่างกลูโคสและกากน้ำตาล ที่อัตราส่วนแตกต่างกันที่ร้อยละ 0, 20, 40, 60, 80 และ 100 ปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนต 150 กรัมต่อลิตร ในอาหารปริมาตร 30 มิลลิลิตร พลาสติกขนาด 100 มิลลิลิตร โดยทำการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 52 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าที่อัตราส่วนระหว่างกลูโคสต่อกากน้ำตาลร้อยละ 20 ให้ผลผลิตกรดแลคติกสูงที่สุด 56.7 กรัมต่อลิตร และสูงกว่าการใช้

แหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลกลูโคสเพียงอย่างเดียวที่ความเข้มข้น 250 กรัมต่อลิตรเท่ากัน ให้ผลผลิตกรดแลคติก 51.7 กรัมต่อลิตร ซึ่งคาดว่าเกิดจากในกากน้ำตาลประกอบไปด้วยสารอาหารหลากหลายชนิด และตั้งแต่อัตราส่วนระหว่างกลูโคสต่อกากน้ำตาลร้อยละ 60 จะได้ผลผลิต กรดแลคติก น้อยกว่าการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงชนิดเดียว อาจเป็นผลเนื่องจากการมีสารพิษในกากน้ำตาลที่มากเกินไป โดยในกากน้ำตาลจากอ้อยที่ใช้มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดร้อยละ 45.5 ไนโตรเจนร้อยละ 0.5 โดยมวลต่อปริมาตร และยังมีสารพิษอย่าง 5-ไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรอน (5-hydroxymethylfurfural, 5-HMF) และไอออนโลหะที่มากเกินไป ซึ่งหากใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนโดยที่ไม่ผสมกับแหล่งคาร์บอนอื่นจะทำให้มีปริมาณสารพิษที่สูงเกินไป การผสมแหล่งคาร์บอนด้วยสัดส่วนที่เหมาะสมระหว่างกลูโคสกับกากน้ำตาล จึงเป็นผลดีต่อการหลีกเลี่ยงผลกระทบของสารพิษในกากน้ำตาล

2.7.3 ผลของน้ำตาล 3 ชนิดที่เป็นองค์ประกอบหลักในกากน้ำตาลจากอ้อยต่อการผลิตกรดบิวทิริกโดย *Clostridium tyrobutyricum* (Huang และคณะ, 2011)

Huang และคณะ (2011) ได้ทำการศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกันต่อการผลิตกรดบิวทิริก โดยทำการเพาะเลี้ยง *Clostridium tyrobutyricum* ในฟลาสก์ด้วยอาหารสูตร CGM (*Clostridium* growth medium) และทำการปรับเปลี่ยนแหล่งไนโตรเจนเป็น ยูเรีย โปแทสเซียมไนเตรต น้ำหมักข้าวโพด ปลาป่น ยีสต์สกัด เปปโตน และสารสกัดจากเนื้อวัว ที่ความเข้มข้น 5, 5, 15, 10, 10, 10 และ 10 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งได้ผลผลิตกรดบิวทิริกเท่ากับ 6.09, 6.32, 9.44, 6.69, 8.13 และ 10.91 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยพบว่าแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์อย่างยูเรียและโปแทสเซียมไนเตรต สามารถผลิตกรดบิวทิริกได้ปริมาณที่ต่ำกว่าแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์อย่าง น้ำหมักข้าวโพด เปปโตน และสารสกัดจากเนื้อวัว จากนั้นจึงทำการเลือกน้ำหมักข้าวโพดเป็นแหล่งไนโตรเจนซึ่งมีราคาถูกที่สุดเพื่อทำการศึกษาในการทดลองถัดไป

Huang และคณะ (2011) ได้ทำการศึกษาผลของปริมาณแหล่งไนโตรเจนต่อการเจริญเติบโตของเซลล์และการผลิตกรดบิวทิริก โดยใช้ น้ำหมักข้าวโพดเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้น 2.5, 5, 10 และ 15 กรัมต่อลิตร พบว่าที่ความเข้มข้น 2.5 – 10 กรัมต่อลิตร ให้ผลผลิตกรดบิวทิริก ผลได้และอัตราการผลิตเพิ่มสูงขึ้น แต่จะลดลงเมื่อใช้ความเข้มข้นที่มากกว่า 10 กรัมต่อลิตร ในขณะที่การเจริญเติบโตของเซลล์ที่ปริมาณแหล่งไนโตรเจน 2.5 และ 15 กรัมต่อลิตร เชื่อใช้เวลาในการปรับตัวยาวนานกว่าที่มีปริมาณแหล่งไนโตรเจนเข้มข้น 5 และ 10 กรัมต่อลิตร ดังนั้นปริมาณแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของ *Clostridium tyrobutyricum* คือที่ 10 กรัมต่อลิตร

นอกจากนี้ Huang และคณะ (2011) ได้ทำการศึกษาผลของปริมาณน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นต่อการผลิตกรดบิวทิริก โดยทำการเพาะเลี้ยงเซลล์อิสระของ *Clostridium tyrobutyricum* ในถังหมัก

ขนาด 5 ลิตร กำหนดให้มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นที่แตกต่างกันคือ 20, 40, 60, 80, 100 และ 120 กรัมต่อลิตร พบว่าปริมาณกรดบิวทิริกที่ผลิตได้นั้นเพิ่มขึ้นตามปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นในช่วงความเข้มข้น 20 – 60 กรัมต่อลิตร โดยมีผลผลิตกรดบิวทิริกสูงสุดที่ 21.28 กรัมต่อลิตร และอัตราการผลิต 0.845 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ที่ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเข้มข้น 60 กรัมต่อลิตร และค่าผลได้เท่ากับ 0.41 กรัมต่อกรัม ซึ่งใกล้เคียงกับค่าผลได้ทางทฤษฎีสูงสุด 0.49 กรัมต่อกรัม และที่ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเข้มข้นมากกว่า 60 กรัมต่อลิตร จะเกิดการยับยั้งโดยสับสเตรท ทำให้ค่าผลได้ของกรดบิวทิริกลดลง

Huang และคณะ (2011) ยังได้ทำการศึกษาผลของน้ำตาลฟรุกโตสและน้ำตาลซูโครสต่อการผลิตกรดบิวทิริก เป็นที่ทราบกันดีอยู่แล้วว่าในกากน้ำตาลมีน้ำตาลกลูโคส ฟรุกโตส และซูโครสเป็นองค์ประกอบ การทดลองนี้จึงทำการศึกษาเพื่อดูความสามารถในการใช้น้ำตาลในกากน้ำตาลจากอ้อยต่อการผลิตกรดบิวทิริกโดย *Clostridium tyrobutyricum* และผลกระทบของน้ำตาลฟรุกโตสและน้ำตาลซูโครสต่อการผลิตกรดบิวทิริก จากผลการทดลอง พบว่า น้ำตาลทั้งสามชนิดสามารถนำมาใช้ในการผลิตกรดบิวทิริกได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยได้ผลผลิตกรดบิวทิริกสูงสุด 21.28 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลกลูโคสเข้มข้น 60 กรัมต่อลิตร และน้ำตาลฟรุกโตสก็ถือว่าเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีเทียบเท่ากับน้ำตาลกลูโคส เนื่องจากให้ผลผลิตกรดบิวทิริก อัตราการผลิต และค่าผลได้ของกรดบิวทิริกใกล้เคียงกับกลูโคส คือ 20.26 กรัมต่อลิตร 0.70 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และ 0.34 กรัมต่อกรัม ตามลำดับ ส่วนน้ำตาลซูโครสจะให้ผลผลิตกรดบิวทิริก และอัตราการผลิตน้อยกว่าคือ 18.85 กรัมต่อลิตร และ 0.29 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ

และ Huang และคณะ (2011) ได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพการผลิตกรดบิวทิริกกับน้ำตาลในถังหมักแบบ Fibrous-bed bioreactor (FBB) โดยทำการผสมน้ำตาลสามชนิดคือ กลูโคส ฟรุกโตส และซูโครสในอัตราส่วนปริมาณน้ำตาลที่มีในกากน้ำตาล คือ 10, 15 และ 35 กรัมต่อลิตร แต่เนื่องจากน้ำตาลกลูโคสและฟรุกโตสจะถูกนำไปใช้ได้เร็วกว่าน้ำตาลซูโครส จึงทำการปรับเปลี่ยนส่วนผสมของน้ำตาลเป็น กลูโคส 15 กรัมต่อลิตร ฟรุกโตส 20 กรัมต่อลิตร และซูโครส 35 กรัมต่อลิตร ทำการเพาะเลี้ยงในถังหมักเป็นเวลา 120 ชั่วโมง ได้ผลผลิตกรดบิวทิริก 40.11 กรัมต่อลิตร ซึ่งจากการจำลองส่วนผสมน้ำตาลในกากน้ำตาลนี้ให้ผลผลิตสูง ชี้ให้เห็นว่าการใช้กากน้ำตาลจากอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อลดต้นทุนการผลิตจะสามารถผลิตกรดบิวทิริกได้อย่างมีประสิทธิภาพ

บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

- 3.1.1 กระจกบอทวง
- 3.1.2 ขวดบรรจุอาหาร (Duran)
- 3.1.3 ขวดรูปชมพู่ ขนาด 125 มิลลิลิตร
- 3.1.4 ขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร
- 3.1.5 เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker) ยี่ห้อ NEW BRUNSWICK รุ่น innova 4230 ประเทศแคนาดา
- 3.1.6 เครื่องซั่ง 3 ตำแหน่ง ยี่ห้อ AND รุ่น GF-800 ประเทศญี่ปุ่น
- 3.1.7 เครื่องซั่ง 4 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Denver Instrument รุ่น SI-234 ประเทศเยอรมัน
- 3.1.8 เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) ยี่ห้อ HIRAYAMA รุ่น HV-25/50/85/110 ประเทศญี่ปุ่น
- 3.1.9 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) ยี่ห้อ HERMLE Labortechnik GmbH รุ่น Z326K ประเทศเยอรมัน
- 3.1.10 เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (Microcentrifuge) ยี่ห้อ Spectrafuge ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.1.11 เครื่องวัดค่าพีเอช (pH meter) ยี่ห้อ SevenCompact รุ่น S220-Kit ประเทศเยอรมัน
- 3.1.12 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) ยี่ห้อ Shimadzu รุ่น UV-1800 ประเทศสิงคโปร์
- 3.1.13 เครื่องเขย่าสารละลาย (Vortex Mixer) ยี่ห้อ Scientific Industries รุ่น G560E ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.1.14 จานเพาะเลี้ยงเชื้อ (Petri dish)
- 3.1.15 ชุดขาตั้งและแคลมป์จับ
- 3.1.16 ซ้อนตักสาร
- 3.1.17 ตะเกียงแอลกอฮอล์

- 3.1.18 ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar Air Flow) ยี่ห้อ Heal Force รุ่น AlphaClean 1300 ประเทศจีน
- 3.1.19 ตู้อบลมร้อน (Hot Air Oven) ยี่ห้อ Contherm รุ่น 7050 ประเทศนิวซีแลนด์
- 3.1.20 โถดูดความชื้น (Desiccator)
- 3.1.21 ที่วางหลอดทดลอง (Rack)
- 3.1.22 แท่งแก้ว
- 3.1.23 บิวเรต
- 3.1.24 ปีกเกอร์
- 3.1.25 ปิเปต
- 3.1.26 ปิเปตทิป (Pipette Tip)
- 3.1.27 ไมโครปิเปต (Micropipettes หรือ Autopipettes)
- 3.1.28 ลูกยางดูดสาร
- 3.1.29 ลวดเขี่ยเชื้อ (loop)
- 3.1.30 หลอดเซนตริฟิวก์ (Centrifuge tube)
- 3.1.31 หลอดทดลอง
- 3.1.32 หลอดไมโครเซนตริฟิวก์ (Microcentrifuge tube หรือ Eppendorf tube)

3.2 สารเคมี

- 3.2.1 Agar ยี่ห้อ Himedia ประเทศอินเดีย
- 3.2.2 Alcohol 70%
- 3.2.3 Alcohol 95%
- 3.2.4 Ammonium chloride (NH_4Cl) ยี่ห้อ Univar reagent ประเทศออสเตรเลีย
- 3.2.5 Calcium carbonate (CaCO_3) ยี่ห้อ Univar reagent ประเทศออสเตรเลีย
- 3.2.6 Calcium hydroxide ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) ยี่ห้อ Merck KGaA ประเทศเยอรมัน
- 3.2.7 Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) ยี่ห้อ Univar reagent ประเทศออสเตรเลีย
- 3.2.8 Fructose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) ยี่ห้อ Fisher Chemical ประเทศอังกฤษ
- 3.2.9 Glucose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) ยี่ห้อ Huakang ประเทศจีน
- 3.2.10 Glycerol ยี่ห้อ Fisher Chemical ประเทศอังกฤษ

- 3.2.11 Hydrochloric acid (HCl) ยี่ห้อ Loba Chemie ประเทศอินเดีย
- 3.2.12 Hydroxy Naphthol Blue indicator grade ยี่ห้อ Loba chemie ประเทศอินเดีย
- 3.2.13 Magnesium sulfate ($MgSO_4$) ยี่ห้อ Fluka Chemika ประเทศสวิสเซอร์แลนด์
- 3.2.14 Magnesium sulfate heptahydrate ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) ยี่ห้อ Fluka Chemika ประเทศสวิสเซอร์แลนด์
- 3.2.15 Methanol ยี่ห้อ Honey well ประเทศเกาหลี
- 3.2.16 Potassium sulfate heptahydrate (KH_2PO_4) ยี่ห้อ CARLO ERBA Reagents ประเทศอิตาลี
- 3.2.17 Sodium hydroxide (NaOH) ยี่ห้อ Univar reagent ประเทศออสเตรเลีย
- 3.2.18 Sulfuric acid (H_2SO_4) ยี่ห้อ Univar reagent ประเทศออสเตรเลีย
- 3.2.19 Yeast extract ยี่ห้อ Scharlau Microbiology ประเทศอังกฤษ
- 3.2.20 Zinc sulfate ($ZnSO_4$) ยี่ห้อ Fluka Chemika ประเทศสวิสเซอร์แลนด์
- 3.2.21 กากน้ำตาล ยี่ห้อ MMolasses โรงงานมิตรผล ประเทศไทย

3.3 ขั้นตอนการดำเนินงาน

3.3.1 แบคทีเรียที่ใช้ศึกษา

แบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษา คือ แบคทีเรียไอโซเลต AG2 ซึ่งคัดแยกได้จากฟรังเนา โดยประภัสสรและสุพรรณนิภา (2557)

3.3.2 การเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรียตั้งต้น

ทำการเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้นแบคทีเรียไอโซเลต AG2 จากหับทิม กุลรัตน์ และคณะ (2559) ในอาหารแข็ง selective medium (ภาคผนวก ก.1.1) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ถึง 7 วัน จากนั้นถ่ายเชื้อแบคทีเรีย 1 - 2 ลูบ ลงในอาหารเหลว selective medium ปริมาตร 20 มิลลิลิตร มีแคลเซียมคาร์บอเนต 5.0 กรัมต่อลิตร (ร้อยละ 0.5 โดยมวลต่อปริมาตร) ในพลาสติก ขนาด 125 มิลลิลิตร นำไปเลี้ยงในสภาวะเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 ถึง 24 ชั่วโมง แล้วทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรให้อยู่ในช่วง 1.4 - 1.5

3.3.3 การปรับสภาพกากน้ำตาล

3.3.3.1 การปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกและแคลเซียมไฮดรอกไซด์

ทำการเจือจางกากน้ำตาลด้วยน้ำกลั่น ให้มีความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมด (Total sugar) ประมาณ 200 กรัมต่อลิตร และนำมาปรับพีเอชให้ได้ 3.0 ด้วยกรดซัลฟูริก ความเข้มข้น 3 โมลาร์ จากนั้นนำกากน้ำตาลไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที และตั้งทิ้งไว้ให้เย็นและนำไปบ่มข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 9000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกเศษตะกอนที่ไม่ต้องการออก และนำส่วนใสที่ได้ไปทำการปรับพีเอชให้อยู่ในช่วง 6.0 ด้วยแคลเซียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1 โมลาร์ และนำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็วรอบ 9000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที โดยทำการปั่นเหวี่ยงจนแยกเอาตะกอนที่ไม่ต้องการออกจนหมด จากนั้นจะทำการเก็บกากน้ำตาลที่ปรับสภาพแล้วไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป (ดัดแปลงจาก Cheng และคณะ, 2017)

3.3.3.2 การปรับสภาพกากน้ำตาลด้วยถ่านกัมมันต์

ทำการเจือจางกากน้ำตาลด้วยน้ำกลั่น ให้มีความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมด (Total sugar) ประมาณ 200 กรัมต่อลิตร จากนั้นจึงทำการเติมผงถ่านปริมาณ 50 กรัมต่อลิตร และนำไปปั่นกวนด้วยเครื่องกวนสารให้ความร้อน (Hotplate stirrer) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วนำสารละลายไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 9000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที โดยทำการปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเอาส่วนตะกอนผงถ่านออกจนหมด จากนั้นจะทำการเก็บกากน้ำตาลที่ปรับสภาพแล้วไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป (ดัดแปลงจาก Wei และคณะ, 2017)

3.3.4 กระบวนการหมักแบคทีเรียไอโซเลต AG2 ในพลาสติก

3.3.4.1 ศึกษาผลของวิธีการปรับสภาพกากน้ำตาลต่อการผลิตกรดมาลิก

ทำการเพาะเลี้ยงไอโซเลต AG2 โดยใช้อาหารสูตร basic medium (ภาคผนวก ก.1.2) โดยทับทิม กุลรัตน์ และคณะ (2559) ทำการศึกษามาก่อนหน้านี้แล้วพบว่า เป็นอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดมาลิกด้วยแบคทีเรียไอโซเลต AG2 โดยทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารปริมาตร 30 มิลลิลิตร ในพลาสติกขนาด 125 มิลลิลิตร และใช้กากน้ำตาลที่ไม่ได้ปรับสภาพ กากน้ำตาลปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกและแคลเซียมไฮดรอกไซด์ หรือกากน้ำตาลปรับสภาพด้วยผงถ่านเป็นแหล่งคาร์บอน โดยมีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเริ่มต้น 150 กรัมต่อลิตร จากนั้นจึงเติมหัวเชื้อเริ่มต้นที่ได้จากข้อ 3.3.2 ร้อยละ 10 โดยปริมาตร แล้วนำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สภาวะเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที โดยทำการทดลองทั้งหมด 4 ซ้ำ และเก็บตัวอย่างทุกสองวันเป็นเวลา 6 วัน

3.3.4.2 ศึกษาผลของการปรับสภาพกากน้ำตาลด้วยกรดซัลฟูริกที่ค่าพีเอชแตกต่างกันต่อการผลิตกรดมาลิก

จากการศึกษาผลของวิธีการปรับสภาพกากน้ำตาล พบว่าเมื่อใช้กากน้ำตาลที่ทำการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกและแคลเซียมไฮดรอกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอน ไอโซเลต AG2 สามารถผลิตแคลเซียมมาเลตได้สูงสุด ดังนั้นจึงใช้แหล่งคาร์บอนในอาหารสูตร basic medium เป็นกากน้ำตาลที่ทำการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกให้มีค่าพีเอชแตกต่างกัน ได้แก่ 1.0, 2.0 และ 3.0 โดยใช้ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในกากน้ำตาลเริ่มต้นเข้มข้น 200 กรัมต่อลิตร จากนั้นจึงใส่หัวเชื้อเริ่มต้นที่ได้จากข้อ 3.3.2 ร้อยละ 10 โดยปริมาตร นำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สภาวะเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที โดยทำการทดลองทั้งหมด 4 ข้ำ และเก็บตัวอย่างทุกสองวันเป็นเวลา 6 วัน

3.3.4.3 ศึกษาผลของปริมาณแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตกรดมาลิก

ทำการเพาะเลี้ยงไอโซเลต AG2 โดยใช้อาหารสูตร basic medium โดยจะเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารปริมาตร 30 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 125 มิลลิลิตร จากผลการศึกษาในข้อ 3.3.4.2 จึงเลือกใช้กากน้ำตาลที่ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกที่ค่าพีเอชเท่ากับ 2.0 เป็นแหล่งคาร์บอน โดยมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร และใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ปริมาณ 0.00, 1.00, 2.00 และ 4.00 กรัมต่อลิตร จากนั้นจึงเติมหัวเชื้อเริ่มต้นที่ได้จากข้อ 3.3.2 ร้อยละ 10 โดยปริมาตร แล้วนำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สภาวะเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที โดยทำการทดลองทั้งหมด 4 ข้ำ และเก็บตัวอย่างทุกสองวันเป็นเวลา 6 วัน

3.3.5 การเก็บตัวอย่างเพื่อนำไปวิเคราะห์

นำน้ำหมักที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในข้อ 3.3.4.1, 3.3.4.2 หรือ 3.3.4.3 ปริมาตร 4.0 มิลลิลิตร ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 9,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บเอาสารละลายส่วนใสเพื่อนำไปวิเคราะห์ค่าพีเอชด้วยเครื่องวัดค่าพีเอช น้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธีดีเอ็นเอส (Miller, 1959) น้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธีฟีนอล-ซัลฟูริก (Dubois และคณะ, 1956) และปริมาณแคลเซียมมาเลตด้วยวิธีการไทเทรต (FAO, 2006)

3.3.6 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธีดีเอ็นเอส

นำสารละลายตัวอย่างปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ไปเติมสารละลายดีเอ็นเอส ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร และผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร จากนั้นนำไปต้มในน้ำเดือด เป็นเวลา 5 นาที เมื่อครบเวลาแล้วให้นำมาทำให้เย็นทันทีโดยแช่ไว้ในอ่างน้ำเย็น ทำการเติมน้ำกลั่นปริมาตร 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร จากนั้นนำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร โดยใช้กลูโคสเป็นสารละลายมาตรฐาน (Miller, 1959)

3.3.7 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธีฟินอล-ซัลฟูริก

นำสารละลายตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาเติมฟินอลความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร 1 มิลลิลิตร และเติมกรดซัลฟูริกความเข้มข้นร้อยละ 96 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงไปอย่างรวดเร็ว ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 10 นาที ในตู้ดูดควัน นำสารละลายที่ได้มาเขย่าด้วยเครื่องเขย่าสารละลาย ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 – 20 นาที จากนั้นนำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร โดยใช้กลูโคสเป็นสารละลายมาตรฐาน (Dubois และคณะ, 1956)

3.3.8 การตกตะกอนแคลเซียมมาเลต

นำน้ำเลี้ยงปริมาตร 30 มิลลิลิตร ไปทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เพื่อแยกเศษตะกอนเซลล์ออก จากนั้นเทส่วนใสที่ได้ลงไป ในเมทานอลปริมาตร 15 มิลลิลิตร และทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ในขั้นตอนนี้จะเป็นการกำจัดเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ (Exopolysaccharides) จากนั้นจะนำส่วนใสที่ได้มาเติมลงไป ในเมทานอลปริมาตร 30 มิลลิลิตร และนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืนและนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 5000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที โดยเทส่วนใสทิ้งและนำตะกอนที่ได้ไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส จะได้ผลึกของแคลเซียมมาเลต (Wang และคณะ, 2013)

3.3.9 การวิเคราะห์ปริมาณแคลเซียมมาเลตด้วยวิธีการไทเทรต

ชั่งตะกอนจากข้อ 3.3.6 ประมาณ 0.2 กรัม ด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง นำมาละลายด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 3.1 โมลาร์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร และทำการปรับปริมาตรในขวดปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 100 มิลลิลิตร จากนั้นเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1.075 โมลาร์ ปริมาตร 15 มิลลิลิตร และทำการเติมไฮดรอกซีเนปทอลบลู อินดิเคเตอร์ 2-3 หยด และทำการไทเทรตด้วยสารละลาย EDTA ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ เพื่อหาปริมาณแคลเซียมมาเลตทั้งหมด (กรัมต่อลิตร) จากสูตร

$$\left[\frac{(\text{น้ำหนักตะกอนทั้งหมด}) \times (\text{ปริมาณ EDTA}) \times (0.008607)}{\text{น้ำหนักตะกอนที่ใช้ไทเทรต}} \right] / \text{ปริมาณน้ำเลี้ยงที่ใช้ตกตะกอน (ลิตร)}$$

โดย EDTA เข้มข้น 0.05 โมลาร์ 1 มิลลิลิตร จะเท่ากับแคลเซียมมาเลต 8.607 มิลลิกรัม (FAO, 2006)

3.3.10 การวิเคราะห์เพื่อเปรียบเทียบค่าทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS

วิเคราะห์ค่าทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS (Statistical Package for the Social Science) โดยทำการวิเคราะห์แบบ One-way ANOVA ตามวิธีของ Duncan ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

บทที่ 4

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

จากงานวิจัยของทับทิม และคณะ (2559) ได้ทำการศึกษาสูตรอาหารและชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดมาลิกโดยไอโซเลต AG2 โดยทำการเพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร 5 สูตร คือ shaker culture medium, main culture, calcium malate production, production medium และ basic medium พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร basic medium ไอโซเลต AG2 สามารถผลิตแคลเซียมมาเลตได้สูงที่สุด จากนั้นจึงทำการศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนโดยทำการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร basic medium ซึ่งมีแหล่งคาร์บอนแตกต่างกันคือ กลูโคส โซโลส กากน้ำตาลไม่ปรับสภาพ กากน้ำตาลปรับสภาพ ซูโครส และ กลีเซอรอล พบว่าไอโซเลต AG2 สามารถผลิตกรดมาลิกได้สูงสุดในอาหารสูตร basic medium ที่มีกากน้ำตาลปรับสภาพเป็นแหล่งคาร์บอน ดังนั้นทางคณะผู้วิจัยจึงได้นำกากน้ำตาลมาทำการศึกษาผลของวิธีการปรับสภาพกากน้ำตาลและผลของปริมาณแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตกรดมาลิกของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต AG2

4.1 ผลของวิธีการปรับสภาพกากน้ำตาลต่อการผลิตกรดมาลิกโดยแบคทีเรียไอโซเลต AG2

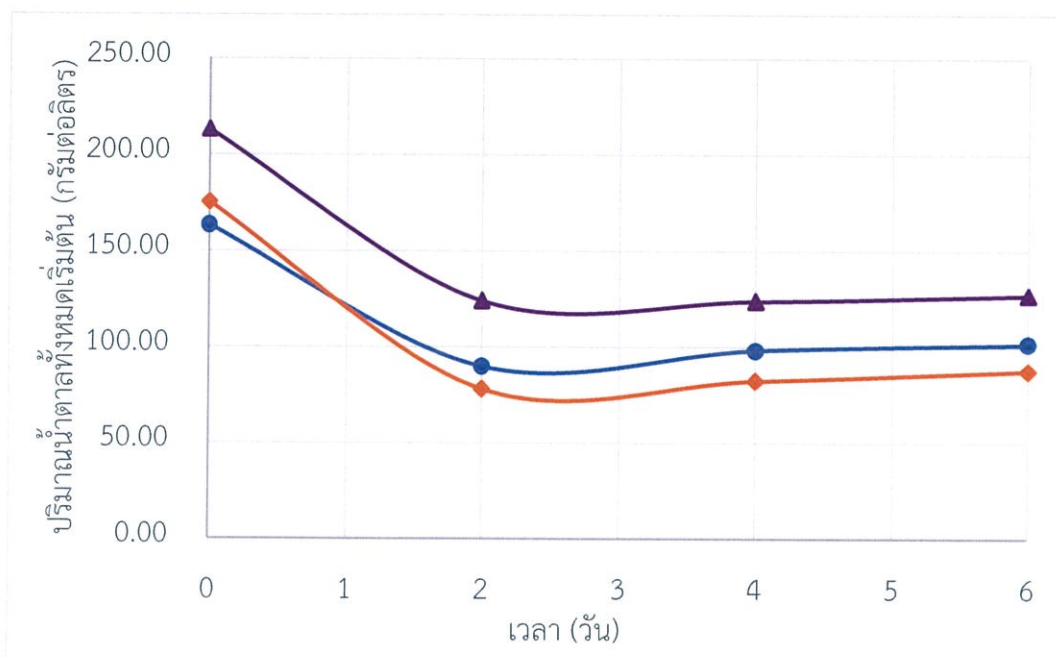
ทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียไอโซเลต AG2 ในอาหารสูตร basic medium โดยใช้แหล่งคาร์บอนเป็นกากน้ำตาลจากโรงงานมิตรผลที่ทำการปรับสภาพด้วยวิธีที่แตกต่างกัน ให้ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในกากน้ำตาลเริ่มต้นเข้มข้น 150 กรัมต่อลิตร แคลเซียมคาร์บอเนต 30 กรัมต่อลิตร ทำการเพาะเลี้ยงที่สภาวะเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 วัน จากนั้นนำน้ำเลี้ยงที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เพื่อแยกเอาตะกอนเซลล์ออกและนำส่วนใสที่ได้ไปตกตะกอนแคลเซียมมาเลตด้วยแอลกอฮอล์ (Wang และคณะ, 2013) วิเคราะห์ปริมาณแคลเซียมมาเลตด้วยวิธีการไทเทรต (FAO, 2006) วัดค่าพีเอชด้วยเครื่องวัดค่าพีเอชและวิเคราะห์น้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธีฟินอล-ซัลฟูริก (Dubois และคณะ, 1956) ซึ่งผลการทดลองที่ได้แสดงดังตารางที่ 4.1

จากตารางที่ 4.1 พบว่าเมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียไอโซเลต AG2 ในอาหารสูตร basic medium โดยใช้แหล่งคาร์บอนเป็นกากน้ำตาลที่ไม่ปรับสภาพ กากน้ำตาลที่ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกและแคลเซียมไฮดรอกไซด์ และกากน้ำตาลที่ปรับสภาพด้วยถ่านกัมมันต์ สามารถผลิตแคลเซียมมาเลตได้ 16.12 ± 0.22 , 19.99 ± 0.56 และ 15.94 ± 1.52 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

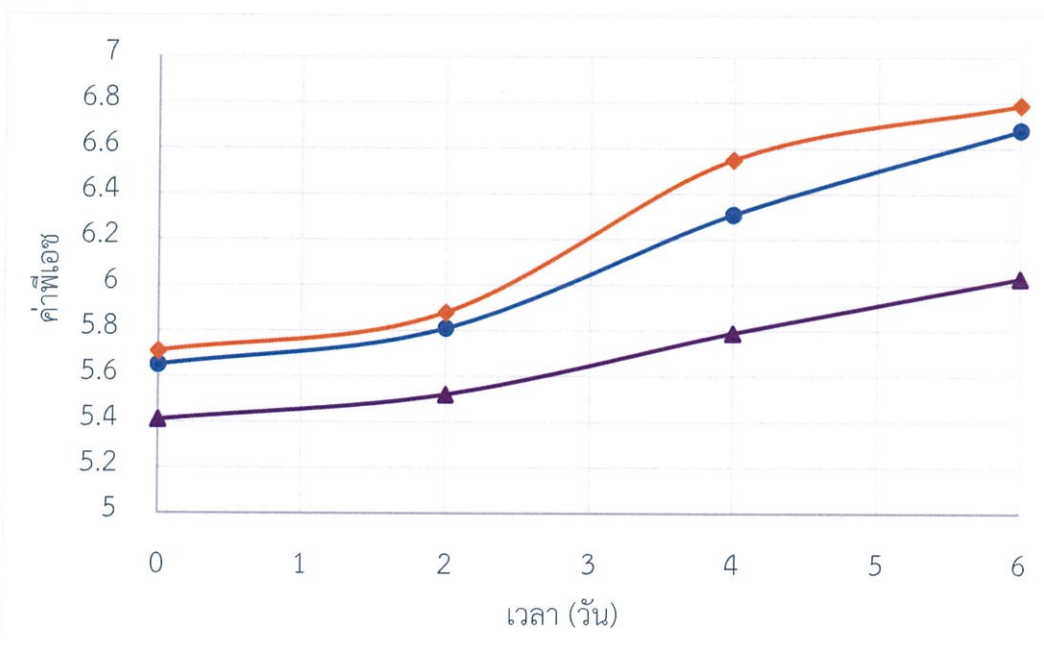
ตารางที่ 4.1 แสดงผลของวิธีการปรับสภาพกากน้ำตาลต่อปริมาณแคลเซียมมาเลต ผลได้ และอัตราการผลิตกรดมาลิกโดยแบคทีเรียไอโซเลต AG2

วิธีการปรับสภาพ	ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	แคลเซียมมาเลต (กรัมต่อลิตร)	ผลได้ (กรัมต่อกรัม น้ำตาลทั้งหมด)	อัตราการผลิต (กรัมต่อลิตร ต่อชั่วโมง)	ค่าพีเอชเริ่มต้น	ค่าพีเอชสุดท้าย
ไม่ปรับสภาพ	163.25 ± 2.98	101.36 ± 1.05	16.12 ^b ± 0.22	0.26 ^a ± 0.00	0.11 ^b ± 0.00	5.65	6.67
ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริก และแคลเซียมไฮดรอกไซด์	175.33 ± 2.98	87.45 ± 2.14	19.99 ^a ± 0.56	0.23 ^b ± 0.01	0.14 ^a ± 0.00	5.71	6.79
ปรับสภาพด้วยถ่านกัมมันต์	213.12 ± 8.64	126.88 ± 7.71	15.94 ^b ± 1.52	0.18 ^c ± 0.02	0.11 ^b ± 0.01	5.41	6.03

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรเหมือนกันในแนวสทมภ์ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05



(A)



(B)

รูปที่ 4.1

กราฟแสดงปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ (A) และค่าพีเอช (B) เมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียไอโซเลต AG2 เป็นเวลา 6 วัน ในอาหารสูตร basic medium ที่มีกากน้ำตาลที่ไม่ปรับสภาพ (●) กากน้ำตาลที่ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกและแคลเซียมไฮดรอกไซด์ (◆) และกากน้ำตาลที่ปรับสภาพด้วยถ่านกัมมันต์ (▲) เป็นแหล่งคาร์บอน

เมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียไอโซเลต AG2 เป็นเวลา 6 วัน โดยใช้แหล่งคาร์บอนเป็นกากน้ำตาลของโรงงานมิตรผลที่ไม่ปรับสภาพ พบว่าปริมาณน้ำตาลทั้งหมดลดลงอย่างเห็นได้ชัดในระยะเวลา 2 วันแรก จาก 163.25 ± 2.98 เหลือ 89.87 ± 2.06 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 4.2A) แล้วตั้งแต่วันที่ 4 จนถึงวันที่ 6 ปริมาณน้ำตาลค่อนข้างคงที่ (รูปที่ 4.2A) ในขณะที่ค่าพีเอชค่อย ๆ เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจาก 5.65 5.81 6.31 และ 6.68 ตามลำดับ (รูปที่ 4.2B)

เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนเป็นกากน้ำตาลที่ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกและแคลเซียมไฮดรอกไซด์ พบว่าปริมาณน้ำตาลทั้งหมดลดลงอย่างเห็นได้ชัดในระยะเวลา 2 วันแรก จาก 175.33 ± 2.98 เหลือ 78.16 ± 2.06 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 4.2A) แล้วตั้งแต่วันที่ 4 จนถึงวันที่ 6 ปริมาณน้ำตาลค่อนข้างคงที่ (รูปที่ 4.2A) ในขณะที่ค่าพีเอชค่อย ๆ เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจาก 5.71 5.88 6.55 และ 6.79 ตามลำดับ (รูปที่ 4.2B)

เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนเป็นกากน้ำตาลที่ปรับสภาพด้วยถ่านกัมมันต์ พบว่าปริมาณน้ำตาลทั้งหมดลดลงอย่างเห็นได้ชัดในระยะเวลา 2 วันแรก จาก 213.12 ± 8.64 เหลือ 124.04 ± 1.97 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 4.2A) แล้วตั้งแต่วันที่ 4 จนถึงวันที่ 6 ปริมาณน้ำตาลค่อนข้างคงที่ (รูปที่ 4.2A) ในขณะที่ค่าพีเอชค่อย ๆ เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจาก 5.41 5.52 5.79 และ 6.03 ตามลำดับ (รูปที่ 4.2B)

เมื่อเปรียบเทียบการใช้กากน้ำตาลที่ทำการปรับสภาพด้วยวิธีแตกต่างกันเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่ามีอัตราการใช้น้ำตาลที่ใกล้เคียงกัน คือปริมาณน้ำตาลลดลงอย่างรวดเร็วในช่วง 2 วันแรก หลังจากนั้นปริมาณน้ำตาลค่อนข้างคงที่ตั้งแต่วันที่ 4 จนถึงวันที่ 6 ส่วนค่าพีเอชในวันสุดท้ายเพิ่มขึ้นจากวันแรกเช่นเดียวกัน ซึ่งการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชในอาหารเพาะเลี้ยงนี้สามารถอธิบายได้จากรูปที่ 2.2 คือที่ค่าพีเอชสูงกรดมาลิกสามารถแตกตัวได้อย่างสมบูรณ์ แสดงว่ามีปริมาณกรดมาลิกแตกตัวอยู่ในรูปของมาเลตสูง (Lameloise และคณะ, 2009)

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณแคลเซียมมาเลตที่ผลิตได้โดยเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต AG2 ในอาหารสูตร basic medium ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกากน้ำตาลที่ทำการปรับสภาพด้วยวิธีแตกต่างกัน (แสดงดังรูปที่ 4.1) ด้วยการใช้วิเคราะห์ค่าทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS แบบ One-way ANOVA ตามวิธีของ Duncan ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 พบว่าการใช้กากน้ำตาลที่ทำการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกและแคลเซียมไฮดรอกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอนให้ผลผลิตของกรดมาลิกสูงกว่าการใช้กากน้ำตาลที่ไม่ทำการปรับสภาพและกากน้ำตาลที่ทำการปรับสภาพด้วยถ่านกัมมันต์เป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 จึงคาดว่าวิธีการปรับสภาพกากน้ำตาลอาจมีผลต่อองค์ประกอบหลักในกากน้ำตาลทำให้ได้ผลผลิตแคลเซียมมาเลตที่แตกต่างกัน โดยในกากน้ำตาลมีปริมาณน้ำตาลสูง และยังมีแร่ธาตุ สารประกอบอินทรีย์และวิตามินที่เป็นสารอาหารที่สำคัญต่อกระบวนการหมัก และโลหะหนัก ซึ่งองค์ประกอบของกากน้ำตาลในแต่ละโรงงานจะมีความแตกต่างกัน แสดงดังตารางที่ 2.4 แต่ปริมาณโลหะหนักที่มีมากเกินไปจะเป็นพิษต่อเซลล์ ยับยั้งการเจริญเติบโตและวิถีเมแทบอลิซึมของเซลล์ ซึ่งสามารถลดปริมาณโลหะหนักได้ด้วยวิธีการทำให้เกิดการจับกันเป็นกลุ่มแล้วตกตะกอน (Flocculation and sedimentation treatment) เช่น การปรับสภาพด้วยถ่านกัมมันต์ การปรับสภาพด้วยเฟอร์โรไซยาไนด์ การปรับสภาพด้วยโพสโตะคลีไลต์ และการปรับสภาพด้วยแคลเซียมไฮดรอกไซด์ เป็นต้น โดยการปรับสภาพด้วยถ่านกัมมันต์จะอาศัยหลักการดูดซับจับกับไอออนโลหะหนักเป็นกลุ่มแล้วตกตะกอน ส่วนการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกและแคลเซียมไฮดรอกไซด์ เป็นการตกตะกอนไอออนโลหะหนักในรูปของซัลไฟด์และไฮดรอกไซด์ โดยการควบคุมค่าพีเอช สารเคมีจะทำปฏิกิริยากับไอออนโลหะหนัก เกิดการจับกันเป็นตะกอนที่ไม่ละลายน้ำ และการปรับสภาพด้วยวิธีนี้ไม่เพียงแต่กำจัดไอออนโลหะเท่านั้น แต่ยังช่วยย่อยสลายซูโครสให้น้ำตาลเฮกโซสอย่างกลูโคสและฟรุกโตสอีกด้วย โดยจะเกิดขึ้นในสารละลายที่มีอุณหภูมิสูงและมีกรดซัลฟูริกเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (Bower และคณะ, 2008) จึงเป็นผลให้ควรเลือกใช้การปรับสภาพกากน้ำตาลด้วยวิธีนี้ เพื่อให้ได้ผลผลิตสูงสุด เนื่องจากงานวิจัยของทับทิม และคณะ (2559) ได้แสดงให้เห็นแล้วว่าแบคทีเรียไอโซเลต AG2 สามารถให้ผลผลิตแคลเซียมมาเลตสูงสุดเมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ในขณะที่เมื่อใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน แบคทีเรียไอโซเลต AG2 ไม่สามารถผลิตแคลเซียมมาเลตได้ นอกจากนี้ Abdel-Rahman และคณะ (2016) ได้ทำการศึกษาวิธีการปรับสภาพกากน้ำตาลที่สามารถกำจัดโลหะหนักได้อย่างมีประสิทธิภาพ พบว่าวิธีการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกเป็นวิธีที่ดีที่สุด เมื่อเทียบกับวิธีการปรับสภาพด้วยไตรแคลเซียมฟอสเฟต การปรับสภาพด้วยโพแทสเซียมเฟอร์โรไซยาไนด์ และการปรับสภาพด้วย EDTA ดังนั้นในการทดลองนี้จึงเลือกใช้วิธีการปรับสภาพกากน้ำตาลด้วยกรดซัลฟูริกและแคลเซียมไฮดรอกไซด์ เพื่อนำไปศึกษาต่อไป

4.2 ผลของการปรับสภาพกากน้ำตาลด้วยกรดซัลฟูริกที่ค่าพีเอชแตกต่างกันต่อการผลิตกรดมาลิกโดยแบคทีเรียไอโซเลต AG2

จากการทดลองก่อนหน้าที่ได้ทำการศึกษาวิธีการปรับสภาพกากน้ำตาลต่อการผลิตกรดมาลิกโดยแบคทีเรียไอโซเลต AG2 พบว่าเมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียไอโซเลต AG2 ในอาหาร basic medium ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกากน้ำตาลที่ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกและแคลเซียมไฮดรอกไซด์ให้ผลผลิตกรดมาลิกสูงสุด จึงเป็นผลให้เลือกใช้วิธีการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกและแคลเซียมไฮดรอกไซด์มาศึกษาต่อ โดยทำการปรับสภาพกากน้ำตาลด้วยกรดซัลฟูริกเข้มข้น 3 โมลาร์ ที่ค่าพีเอชเท่ากับ 1.0, 2.0 และ 3.0 จากนั้นจึงนำไปต้มเป็นเวลา 30 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น บ่มข้ามคืนที่ 4 องศาเซลเซียส แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนที่ไม่ต้องการออก หลังจากนั้นจึงนำส่วนใสไปปรับค่าพีเอชให้เท่ากับ 6.0 ด้วยแคลเซียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1 โมลาร์ แล้วทำการปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนออกจนหมดก่อนนำมากากน้ำตาลที่ได้หลังการปรับสภาพนี้มาใช้เป็นแหล่งคาร์บอน โดยกำหนดให้ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในกากน้ำตาลเริ่มต้นเข้มข้น 200 กรัมต่อลิตร ในอาหารสูตร basic medium แคลเซียมคาร์บอเนต 30 กรัมต่อลิตร โดยทำการเพาะเลี้ยงที่สภาวะเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 วัน จากนั้นนำน้ำเลี้ยงที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เพื่อแยกเอาตะกอนเซลล์ออกและนำส่วนใสที่ได้ไปตกตะกอนแคลเซียมมาเลตด้วยแอลกอฮอล์ (Wang และคณะ, 2013) วิเคราะห์ปริมาณแคลเซียมมาเลตด้วยวิธีการไทเทรต (FAO, 2006) วัดค่าพีเอชด้วยเครื่องวัดค่าพีเอช วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธีฟินอล-ซัลฟูริก (Dubois และคณะ, 1956) และวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธีดีเอ็นเอส (Miller, 1959) ซึ่งผลการทดลองที่ได้แสดงดังตารางที่ 4.2

จากตารางที่ 4.2 พบว่า เมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียไอโซเลต AG2 ในอาหารสูตร basic medium โดยใช้แหล่งคาร์บอนเป็นกากน้ำตาลที่ทำการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกที่ค่าพีเอชเท่ากับ 1.0, 2.0 และ 3.0 สามารถผลิตแคลเซียมมาเลตได้ 29.84 ± 0.94 , 28.70 ± 0.69 และ 24.46 ± 0.83 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งปริมาณแคลเซียมมาเลตที่ผลิตได้จากกากน้ำตาลที่ทำการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกที่ค่าพีเอชเท่ากับ 1.0 และ 2.0 ให้ผลผลิตสูงกว่าการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกที่ค่าพีเอชเท่ากับ 3.0 และมีอัตราการผลิตและค่าผลได้เท่ากันคือ 0.20 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และ 0.54 กรัมต่อกรัมน้ำตาลรีดิวซ์ ตามลำดับ

ตารางที่ 4.2 ผลของการปรับสภาพกากน้ำตาลที่ทำการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกที่ค่าพีเอชแตกต่างกัน ต่อปริมาณแคลเซียมมาเลต ผลได้ และอัตราการผลิตกรดมาลิกโดยแบคทีเรียไอโซเลต AG2

ค่าพีเอชที่ใช้ในการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริก	ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)	แคลเซียมมาเลต (กรัมต่อลิตร)	ผลได้ (กรัมต่อกรัม น้ำตาลรีดิวซ์)	อัตราการผลิต (กรัมต่อลิตร ต่อชั่วโมง)
1.0	191.34 ± 4.72	140.22 ± 3.11	29.84 ^a ± 0.94	0.54 ^b ± 0.02	0.20 ^a ± 0.01
2.0	185.83 ± 5.16	137.34 ± 2.19	28.70 ^a ± 0.69	0.54 ^b ± 0.01	0.20 ^a ± 0.01
3.0	196.33 ± 3.64	94.74 ± 0.34	24.46 ^b ± 0.83	0.73 ^a ± 0.03	0.17 ^b ± 0.01

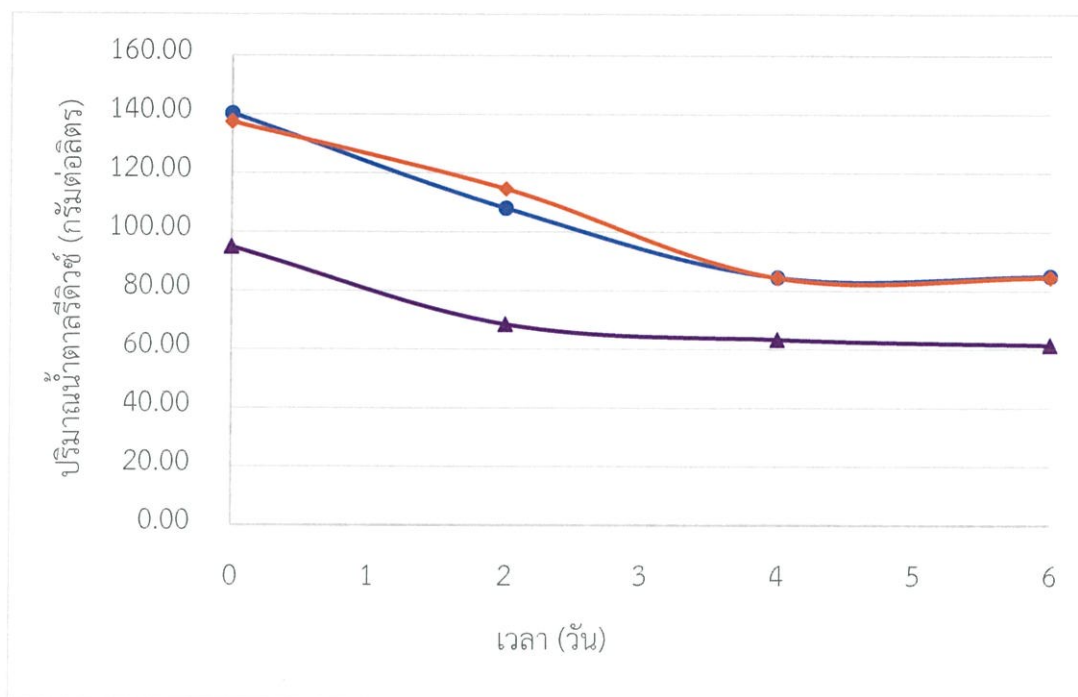
หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรเหมือนกันในแนวสทมภ์ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ระดับนัยสำคัญ 0.05

เมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียไอโซเลต AG2 เป็นเวลา 6 วัน โดยใช้แหล่งคาร์บอนเป็นกากน้ำตาลที่ทำการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกที่ค่าพีเอชเท่ากับ 1.0 พบว่า ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงอย่างต่อเนื่องในระยะเวลา 4 วัน จาก 140.22 ± 3.11 เหลือ 84.44 ± 0.97 กรัมต่อลิตร แล้วไม่ลดลงจนเกือบจะคงที่เมื่อเข้าสู่วันที่ 6 มีปริมาณน้ำตาลเหลือ 84.89 ± 0.80 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 4.2A) ในขณะที่ค่าพีเอชในวันที่ 1 ถึงวันที่ 6 ค่อย ๆ เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจาก 5.55 5.63 5.60 และ 5.79 ตามลำดับ (รูปที่ 4.2B)

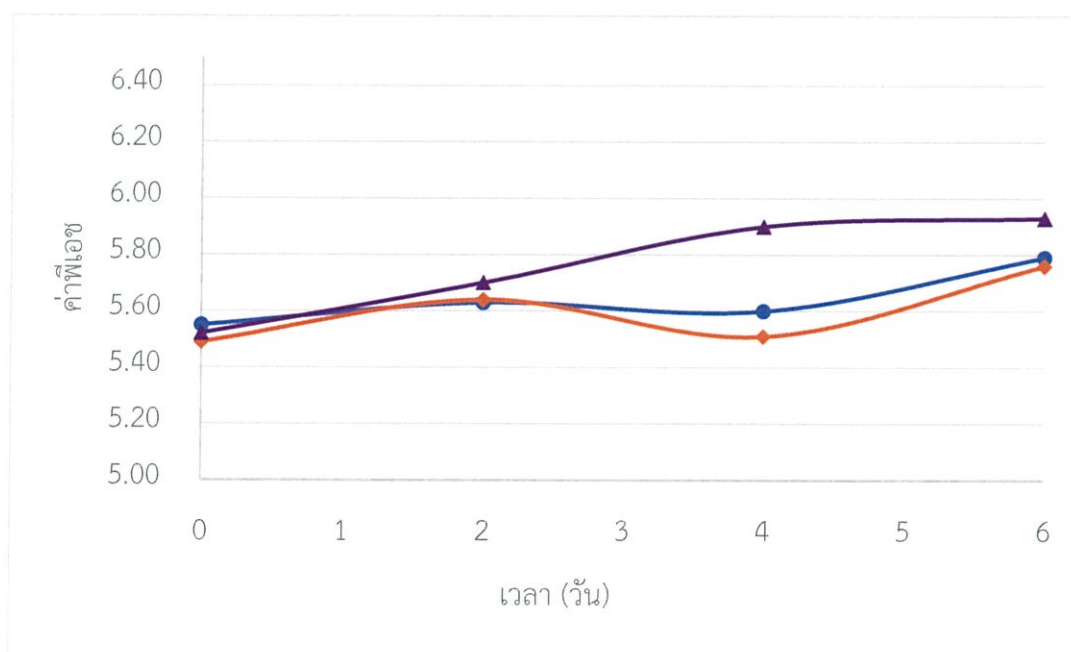
เมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียไอโซเลต AG2 เป็นเวลา 6 วัน โดยใช้แหล่งคาร์บอนเป็นกากน้ำตาลที่ทำการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกที่ค่าพีเอชเท่ากับ 2.0 พบว่า ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงอย่างต่อเนื่องในระยะเวลา 4 วัน จาก 137.33 ± 2.19 เหลือ 84.30 ± 1.26 กรัมต่อลิตร แล้วไม่ลดลงจนเกือบจะคงที่เมื่อเข้าสู่วันที่ 6 มีปริมาณน้ำตาลเหลือ 84.44 ± 1.24 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 4.2A) ในขณะที่ค่าพีเอชในวันที่ 1 ถึงวันที่ 6 ค่อย ๆ เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจาก 5.49 5.64 5.51 และ 5.76 ตามลำดับ (รูปที่ 4.2B)

เมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียไอโซเลต AG2 เป็นเวลา 6 วัน โดยใช้แหล่งคาร์บอนเป็นกากน้ำตาลที่ทำการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกที่ค่าพีเอชเท่ากับ 3.0 พบว่า ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงอย่างเห็นได้ชัดในระยะเวลา 2 วันแรก จาก 94.74 ± 0.34 เหลือ 68.41 ± 1.20 กรัมต่อลิตร แล้วลดลงเพียงเล็กน้อยจนเกือบจะคงที่จนถึงวันที่ 6 มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เหลือ 61.44 ± 0.33 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 4.2A) ในขณะที่ค่าพีเอชในวันที่ 1 ถึงวันที่ 6 ค่อย ๆ เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจาก 5.52 5.70 5.90 และ 5.93 ตามลำดับ (รูปที่ 4.2B)

เมื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น โดยวิธีดีเอ็นเอสในอาหารสูตร basic medium ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกากน้ำตาลที่ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกที่ค่าพีเอชเท่ากับ 1.0, 2.0 และ 3.0 พบว่า มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นเท่ากับ 140.22 ± 3.11 , 137.34 ± 2.19 และ 94.74 ± 0.34 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ แสดงว่าการเพิ่มปริมาณกรดทำให้อัตราการย่อยสลายน้ำตาลซูโครสเพิ่มขึ้น ส่งผลให้มีปริมาณน้ำตาลกลูโคสซึ่งแบคทีเรียโอโซเลต AG2 สามารถนำไปใช้ได้สูงขึ้นด้วยสังเกตได้จากรูปที่ 4.2A ที่กากน้ำตาลที่ทำการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกที่ค่าพีเอชเท่ากับ 1.0 และ 2.0 มีอัตราการใช้น้ำตาลรีดิวซ์ใกล้เคียงกัน คือปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงอย่างต่อเนื่องในช่วงระยะเวลา 4 วันแรก หลังจากนั้นปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ค่อนข้างคงที่จนถึงวันที่ 6 ซึ่งต่างจากกากน้ำตาลที่ทำการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกที่ค่าพีเอชเท่ากับ 3.0 พบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงระยะเวลา 2 วันแรกจากนั้นลดลงเพียงเล็กน้อยจนเกือบจะคงที่จนถึงวันที่ 6 สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ที่พบว่า ภายใต้สภาวะที่มีกรดแก่พื้นระกลโคซิติกของซูโครสจะถูกย่อยสลาย และจะสามารถย่อยสลายได้อย่างรวดเร็วที่อุณหภูมิสูงกว่า 160 องศาเซลเซียส ส่วนการลดค่าพีเอชในสารละลายนั้น เป็นการเพิ่มปริมาณโปรตอนในสารละลายส่งผลให้อัตราการย่อยสลายเพิ่มขึ้นด้วย (Bower และคณะ, 2008) แล้วเมื่อทำการวิเคราะห์ค่าทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS แบบ One-way ANOVA ตามวิธีของ Duncan ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 พบว่าปริมาณแคลเซียมมาเลตที่ผลิตได้จากแหล่งคาร์บอนที่เป็นกากน้ำตาลที่ทำการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกที่ค่าพีเอชเท่ากับ 1.0 และ 2.0 ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ดังนั้นจึงควรเลือกใช้ค่าพีเอชเท่ากับ 2.0 ในการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกสำหรับการศึกษาถัดไป เพื่อเป็นการลดปริมาณสารเคมีที่ใช้และเพื่อประหยัดต้นทุนการผลิต



(A)



(B)

รูปที่ 4.2

กราฟแสดงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ (A) และค่าพีเอช (B) เมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียไอโซเลต AG2 เป็นเวลา 6 วัน ในอาหารสูตร basic medium ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกากน้ำตาลที่ทำการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกที่ค่าพีเอชเท่ากับ 1.0 (●) ค่าพีเอชเท่ากับ 2.0 (◆) และค่าพีเอชเท่ากับ 3.0 (▲)

4.3 ผลของปริมาณแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตกรดมาลิกโดยแบคทีเรียไอโซเลต AG2

ทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียไอโซเลต AG2 ในอาหารสูตร basic medium โดยใช้แหล่งคาร์บอนเป็นกากน้ำตาลจากโรงงานมิตรผลที่ทำการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกที่พีเอชเท่ากับ 2.0 และแคลเซียมไฮดรอกไซด์ โดยให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในกากน้ำตาลเริ่มต้นเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร แคลเซียมคาร์บอเนต 30 กรัมต่อลิตร และทำการเติมแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนในปริมาณที่แตกต่างกัน คือ 0.00, 1.00, 2.00 และ 4.00 กรัมต่อลิตร โดยทำการเพาะเลี้ยงที่สภาวะเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 วัน จากนั้นนำน้ำเลี้ยงที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เพื่อแยกเอาตะกอนเซลล์ออกและนำส่วนใสที่ได้ไปตกตะกอนแคลเซียมมาเลตด้วยแอลกอฮอล์ (Wang และคณะ, 2013) วิเคราะห์ปริมาณแคลเซียมมาเลตด้วยวิธีการไทเทรต (FAO, 2006) วัดค่าพีเอชด้วยเครื่องวัดพีเอชและวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธีดีเอ็นเอส (Miller, 1959) ซึ่งผลการทดลองที่ได้แสดงดังตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 ผลของปริมาณแหล่งไนโตรเจนต่อปริมาณแคลเซียมมาเลต ผลได้ และอัตราการผลิตกรดมาลิกโดยแบคทีเรียไอโซเลต AG2

ปริมาณของแหล่งไนโตรเจน (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	แคลเซียมมาเลต (กรัมต่อลิตร)	ผลได้ (กรัมต่อกรัม น้ำตาลรีดิวซ์)	อัตราการผลิต (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)
0.00	109.48 ± 2.72	69.63 ± 2.87	25.11 ^a ± 0.19	0.66 ^b ± 0.01	0.17 ^a ± 0.00
1.00	113.85 ± 2.23	71.70 ± 1.81	24.69 ^{ab} ± 0.59	0.61 ^{bc} ± 0.01	0.17 ^a ± 0.00
2.00	90.52 ± 1.86	67.70 ± 1.12	24.00 ^{ab} ± 0.24	1.10 ^a ± 0.01	0.17 ^a ± 0.00
4.00	104.00 ± 0.80	64.44 ± 0.80	22.29 ^b ± 2.55	0.59 ^c ± 0.07	0.15 ^a ± 0.02

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรเหมือนกันในแนวสดมภ์ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

จากตารางที่ 4.3 พบว่า เมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียไอโซเลต AG2 ในอาหารสูตร basic medium โดยใช้แหล่งคาร์บอนเป็นกากน้ำตาลที่ทำการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกที่ค่าพีเอชเท่ากับ 2.0 และทำการเติมแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนในปริมาณที่แตกต่างกัน คือ 0, 1, 2 และ 4 กรัมต่อลิตร พบว่าไอโซเลต AG2 สามารถผลิตแคลเซียมมาเลตได้ 25.11 ± 0.19, 24.69 ± 0.59, 24.00 ± 0.24 และ 22.29 ± 2.55 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งในอาหารสูตร basic medium

ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกากน้ำตาลที่ทำการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกที่ค่าพีเอชเท่ากับ 2.0 และทำการเติมแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนปริมาณ 0.00, 1.00 และ 2.00 กรัมต่อลิตร ได้ผลผลิตแคลเซียมมาเลตที่ใกล้เคียงกัน

เมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียไอโซเลต AG2 เป็นเวลา 6 วัน โดยไม่มีการเติมแอมโมเนียมซัลเฟต พบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงอย่างต่อเนื่อง จาก 109.48 ± 2.72 เหลือ 69.63 ± 2.87 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 4.3A) ในขณะที่ค่าพีเอชลดลงในระยะเวลา 2 วันแรก จาก 5.41 เหลือ 5.28 และค่อย ๆ เพิ่มขึ้นในระยะเวลาสองวันสุดท้าย คือ 5.59 และ 5.67 ตามลำดับ (รูปที่ 4.3B)

เมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียไอโซเลต AG2 เป็นเวลา 6 วัน โดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 1.00 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงอย่างต่อเนื่อง จาก 113.85 ± 2.23 เหลือ 71.70 ± 1.81 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 4.3A) ในขณะที่ค่าพีเอชลดลงในระยะเวลา 2 วันแรก จาก 5.54 เหลือ 5.43 และมีค่าพีเอชสูงสุดในวันที่ 4 คือ 5.68 จากนั้นค่าพีเอชค่อย ๆ ลดลงในวันสุดท้ายเหลือ 5.65 (รูปที่ 4.3B)

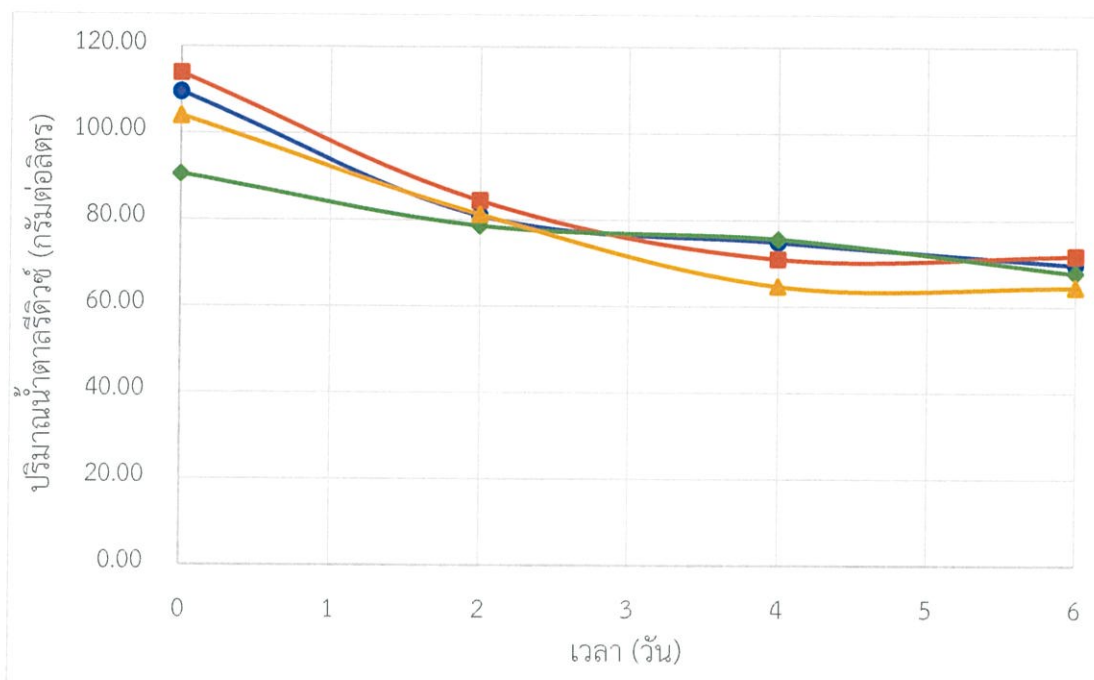
เมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียไอโซเลต AG2 เป็นเวลา 6 วัน โดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 2.00 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงอย่างต่อเนื่อง จาก 90.52 ± 1.86 เหลือ 67.70 ± 1.12 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 4.3A) ในขณะที่ค่าพีเอชลดลงในระยะเวลา 2 วันแรก จาก 5.58 เหลือ 5.46 และค่อย ๆ เพิ่มขึ้นในระยะเวลาสองวันสุดท้าย คือ 5.72 และ 5.72 ตามลำดับ (รูปที่ 4.3B)

เมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียไอโซเลต AG2 เป็นเวลา 6 วัน โดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 4.00 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงอย่างต่อเนื่อง จาก 104.00 ± 0.80 เหลือ 64.44 ± 0.80 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 4.3A) ในขณะที่ค่าพีเอชลดลงในระยะเวลา 2 วันแรก จาก 5.68 เหลือ 5.56 และมีค่าพีเอชสูงสุดในวันที่ 4 คือ 5.83 จากนั้นค่าพีเอชค่อย ๆ ลดลงในวันสุดท้ายเหลือ 5.77 (รูปที่ 4.3B)

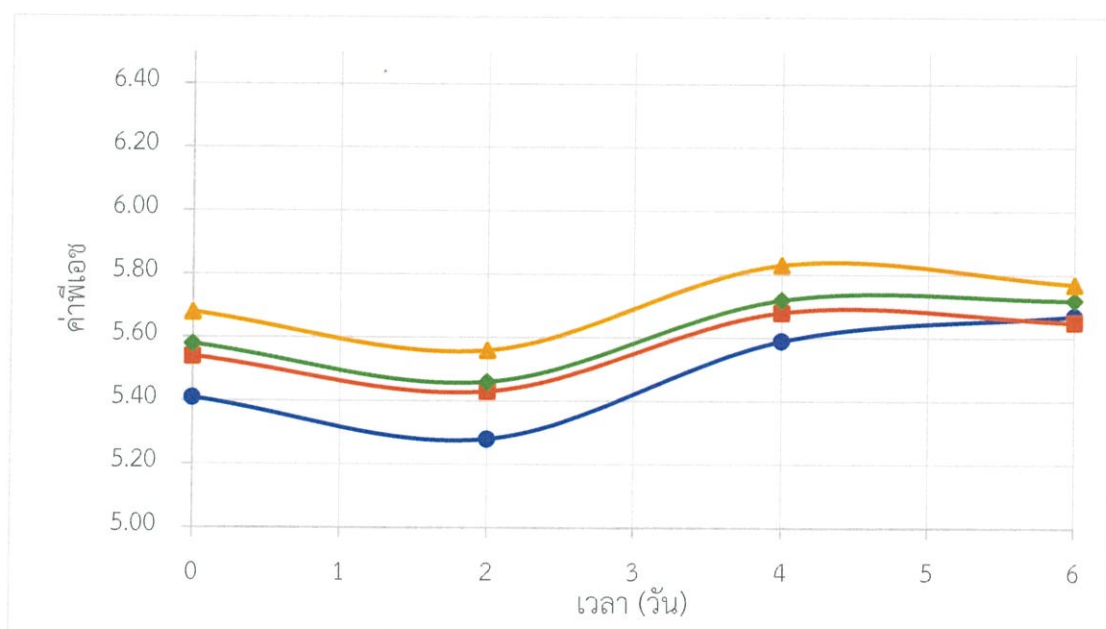
เมื่อทำการวิเคราะห์ค่าทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS แบบ One-way ANOVA ตามวิธีของ Duncan ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 พบว่าปริมาณแคลเซียมมาเลตที่ผลิตได้จากการใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ปริมาณ 0.00, 1.00 และ 2.00 กรัมต่อลิตร ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณแคลเซียมมาเลตที่ผลิตได้จากการไม่เติมแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนกับที่มีการใช้แอมโมเนียมเป็นแหล่งไนโตรเจนปริมาณ 4.00 กรัมต่อลิตร พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 แสดงว่าการใช้แหล่งคาร์บอนเป็นกากน้ำตาลที่ทำการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกที่พีเอชเท่ากับ 2.0 และแคลเซียมไฮดรอกไซด์ โดยไม่มีการเติมแหล่งไนโตรเจน (25.11 ± 0.19 กรัมต่อลิตร) สามารถให้

ผลผลิตแคลเซียมมาเลตได้ปริมาณที่ใกล้เคียงกับการใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ 1.00 (24.69 ± 0.59 กรัมต่อลิตร) และ 2.00 กรัมต่อลิตร (24.00 ± 0.24 กรัมต่อลิตร) และให้ปริมาณแคลเซียมมาเลตสูงกว่าการใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ 4.00 กรัมต่อลิตร (22.29 ± 2.55 กรัมต่อลิตร) อีกด้วย

จากผลการทดลองที่ได้คาดว่าปริมาณแหล่งไนโตรเจนในกากน้ำตาลนั้นอาจเพียงพอต่อความต้องการในการเจริญเติบโตของแบคทีเรียไอโซเลต AG2 แล้ว ซึ่งในกากน้ำตาลแต่ละโรงงานจะมีปริมาณแหล่งไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบแตกต่างกัน เช่น กากน้ำตาลโรงงาน Guangxi Yangpu Nanhua ประเทศจีน มีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดร้อยละ 0.49 โดยมวล (Li และคณะ, 2015) และ กากน้ำตาลโรงงาน Haft Tappeh ประเทศอิหร่าน มีปริมาณแหล่งไนโตรเจนทั้งหมดร้อยละ 0.20 โดยมวล (Torkashvrad และคณะ, 2009) ในขณะที่เมื่อใช้ปริมาณแหล่งไนโตรเจนสูงสุด (4.00 กรัมต่อลิตร) ให้ผลผลิตแคลเซียมมาเลตได้น้อยที่สุดนั้น เนื่องมาจากกระบวนการผลิตกรดอินทรีย์จะเริ่มผลิตเมื่อปริมาณแหล่งไนโตรเจนหมด นั่นก็คือหลังจากกระบวนการผลิตชีวมวลสิ้นสุดลง และปริมาณกรดอินทรีย์ที่ผลิตได้ในปริมาณมาก เกี่ยวเนื่องมาจากอัตราส่วนระหว่างแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจนที่สูง นั้นหมายความว่าปริมาณแหล่งไนโตรเจนในอาหารต่ำ (Ochsenreither และคณะ, 2014) ในสภาวะนี้เซลล์จะหยุดการเจริญเติบโตและการเพิ่มจำนวนเซลล์เมื่อมีปริมาณแหล่งไนโตรเจนจำกัด และเกิดการถ่ายโอนคาร์บอนเข้าสู่กระบวนการผลิตกรดอินทรีย์ (Mondala, 2015) ดังนั้นการที่มีปริมาณแหล่งไนโตรเจนในอาหารมากจึงทำให้ผลผลิตแคลเซียมมาเลตได้น้อยกว่าอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนน้อยกว่า



(A)



(B)

รูปที่ 4.3

กราฟแสดงปริมาณน้ำตารีดิวซ์ที่เหลือ (A) และค่าพีเอช (B) เมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียไอโซเลต AG2 เป็นเวลา 6 วัน ในอาหารสูตร basic medium ที่ใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนในปริมาณที่แตกต่างกัน คือ 0.00 (●), 1.00 (■), 2.00 (◆) และ 4.00 (▲) กรัมต่อลิตร

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

1. เมื่อทำการศึกษามลของวิธีการปรับสภาพกากน้ำตาลต่อการผลิตกรดมาลิกโดยแบคทีเรียไอโซเลต AG2 ในอาหารสูตร basic medium พบว่าแบคทีเรียไอโซเลต AG2 สามารถผลิตแคลเซียมมาเลตได้สูงสุด 19.99 ± 0.56 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนเป็นกากน้ำตาลของโรงงานมิตรผลที่ทำการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกและแคลเซียมไฮดรอกไซด์

2. เมื่อทำการศึกษามลของการปรับสภาพกากน้ำตาลด้วยกรดซัลฟูริกที่ค่าพีเอชแตกต่างกันต่อการผลิตกรดมาลิกโดยแบคทีเรียไอโซเลต AG2 ในอาหารสูตร basic medium พบว่าแบคทีเรียไอโซเลต AG2 สามารถผลิตแคลเซียมมาเลตได้ 29.84 ± 0.94 และ 28.70 ± 0.69 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนเป็นกากน้ำตาลที่ทำการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกที่ค่าพีเอชเท่ากับ 1.0 และ 2.0 ตามลำดับ ซึ่งการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกที่ค่าพีเอชทั้งสองให้ผลผลิตแคลเซียมที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

3. เมื่อทำการศึกษามลของปริมาณแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตกรดมาลิกโดยแบคทีเรียไอโซเลต AG2 ในอาหารสูตร basic medium ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกากน้ำตาลที่ทำการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกที่ค่าพีเอชเท่ากับ 2.0 พบว่าแบคทีเรียไอโซเลต AG2 สามารถผลิตแคลเซียมมาเลตได้สูงสุด 25.11 ± 0.19 กรัมต่อลิตร เมื่อไม่มีการเติมแหล่งไนโตรเจนเข้าไปในอาหาร

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. ควรวิเคราะห์องค์ประกอบของกากน้ำตาลด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) หรือเทคนิคแก๊สโครมาโตกราฟี (Gas-Chromatography, GC) เพื่อให้ทราบองค์ประกอบอื่น ๆ ในกากน้ำตาลที่อาจมีผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตแคลเซียมมาเลต โดยเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต AG2

2. ควรศึกษาปัจจัยอื่น ๆ เช่น ปริมาณแหล่งคาร์บอนเริ่มต้นในกากน้ำตาล ชนิดของแหล่งไนโตรเจนและไอออนโลหะ (Metal ions) ที่อาจมีผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตแคลเซียมมาเลต โดยเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต AG2

3. ควรศึกษาประสิทธิภาพในการผลิตกรดมาลิกจากการใช้แหล่งคาร์บอนเป็นกากน้ำตาลชนิดต่าง ๆ เช่น กากน้ำตาลจากถั่วเหลือง กากน้ำตาลจากหัวบีท

เอกสารอ้างอิง

- ประภัสสร เทพกัณฑ์ และ สุพรรณิภา ยอดสง่า. 2557. การคัดแยกจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตกรดอะดีปิกจากแหล่งธรรมชาติ. โครงการพิเศษระดับวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- ทับทิม กุศลรัตน์, ลักษณะนียา ประสพพรรังสี และ สุนิษา ดาวเรือง. 2559. การศึกษาสภาวะการเพาะเลี้ยงที่สามารถเพิ่มการผลิตกรดมาลิกโดยแบคทีเรียที่คัดแยกได้. โครงการพิเศษระดับวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- Abdel-Rahman, G.N., Nassar, N.R.A., Heikal, Y.A., Abou-Donia, M.A.M., Naguib, M.M. & Fadel, M. (2016). Effect of different treatment on heavy metal concentration in sugar cane molasses. *International Scholarly and Scientific Research & Innovation*. 10(1), 43-48.
- Abe, S., Furuya, A., Saito, T. & Takayama, K. (1962). Method of producing L-malic acid by fermentation. *United States Patent 3,063,910*.
- Ahlgren, C.R. (1968). Manufacture of malic acid. *United States Patent Office*. 9, 260-535.
- Ahn, C.K., Park, D., Woo, S.H. & Park, J.M. (2009). Removal of cationic heavy metal from aqueous solution by activated carbon impregnated with anionic surfactants. *Journal of Hazardous Materials*. 164, 1130-1136.
- Battat, E., Peleg, Y., Bercovitz, A., Rokem, J.S. & Goldberg, I. (1991). Optimization of L-malic acid production by *Aspergillus flavus* in a stirred fermenter. *Biotechnology and Bioengineering*. 37(11), 1108-1116.
- Bower, S., Wickramasinghe, R., Nagle, N.J. & Schell, D.J. (2008). Modeling sucrose hydrolysis in dilute sulfuric acid solutions at pretreatment conditions for lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*. 99, 7354-7362.
- Brown, S.H., Bashkirova, L., Berka, R., Chandler, T., Doty, T., McCall, K., McCulloch, M., McFarland, S., Thompson, S., Yaver, D. & Berry, A. (2013). Metabolic engineering of *Aspergillus oryzae* NRRL 3488 for increased production of L-malic acid. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 97(20), 8903-8912.

- Chen, X.L., Xu, G.Q., Xu, N., Zou, W., Zhu, P., Liu, L.M. & Chen, J. (2013). Metabolic engineering of *Torulopsis glabrata* for malate production. *Metabolic Engineering*. 19, 10–16.
- Chen, X.L., Wang, Y.C., Dong, X.X., Hu, G.P. & Liu, L.M. (2017). Engineering rTCA pathway and C4-dicarboxylate transporter for L-malic acid production. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 101(10), 4041-4052.
- Cheng, C., Zhou, Y., Lin, M., Wei, P. & Yang, S.T. (2017). Polymalic acid fermentation by *Aureobasidium pullulans* for malic acid production from soybean hull and soy molasses: Fermentation kinetics and economic analysis. *Bioresource Technology*. 223, 166–174.
- Chi, Z., Wang, Z.P., Wang, G.Y., Khan, I. & Chi, Z.M. (2016). Microbial biosynthesis and secretion of L-malic acid and its applications. *Critical Reviews in Biotechnology*. 36, 99-107.
- Chunhawong, K., Chaisan, T., Rungmekarat, S. & Khotavivattana, S. (2018). Sugar industry and utilization of its by-products in Thailand: An Overview. *Sugar Technology*. 20(2), 111–115.
- Dai, Z., Zhou, H., Zhang, S., Gua, H., Yang, Q., Zhang, W., Dong, W., Ma, J., Fang, Y., Jiang, M. & Xin, F. (2018). Current advance in biological production of malic acid using wild type and metabolic engineered strains. *Bioresource Technology*. 258, 345-353.
- Deng, Y., Mao, Y. & Zhang, X. (2016). Metabolic engineering of a laboratory-evolved *Thermobifida fusca* muC strain for malic acid production on cellulose and minimal treated lignocellulose. *Biotechnology Progress*. 32, 14–20.
- Dong, X.X., Chen, X.L., Qian, Y.Y., Wang, Y.C., Wang, L., Qiao, W.H. & Liu, L.M. (2017). Metabolic engineering of *Escherichia coli* W3110 to produce L- malate. *Biotechnology and Bioengineering*. 114(3), 656-664.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*. 28(3), 350-356.

- Erb, T.J., Berg, I.A., Brecht, V., Muller, M., Fuchs, G.B. & Alber, E. (2007). Synthesis of C5-dicarboxylic acids from C2-units involving crotonyl-CoA carboxylase / reductase: The ethylmalonyl- CoA pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 104(25), 10631–10636.
- Fu, F. & Wang, Q. (2011). Removal of heavy metal ions from wastewaters: A review. *Journal of Environmental Management*. 92, 407-418.
- Gao, C., Wang, S., Hu, G., Guo, L., Chen, X., Xu, P. & Liu, L., (2017). Engineering *Escherichia coli* for malate production by integrating modular pathway characterization with CRISPRi- guided multiplexed metabolic tuning. *Biotechnology and Bioengineering*. <http://dx.doi.org/10.1002/bit.26486>.
- Goldberg, I., Rokem, J.S., & Pines, O. (2006). Review organic acids: old metabolites, new themes. *Journal Chemistry Technology Biotechnology*. 81, 1601–1611.
- Hahn-Hägerdal, B., Karhumaa, K., Fonseca, C., Spencer-Martins, I. & Gorwa-Grauslund, M.F. (2007). Towards industrial pentose-fermenting yeast strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 74, 937–953.
- Hashizume, T., Higa, S., Sasaki Y., Yamazaki H., Iwamura, H. & Matsuda, H. (1966). Constituents of cane molasses. *Agricultural and Biological Chemistry*. 30(4), 319-329.
- Hofman, M. & Thonart, P. (2001). Pretreatment processes of molasses for the utilization in fermentation processes. *Engineering and Manufacturing for Biotechnology*, Netherlands: Kluwer Academic Publishers. 21–28.
- Hollingworth, R.I. (2003). Process for the preparation of hydroxy substituted gamma butyrolactones. *United States Patent*. RE 38,324 E.
- Hronská, H., Micháliková, S. & Rosenberg, M. (2017). Microbial production of specialty C4 dicarboxylic acids from maleic anhydride. *Journal of Food and Nutrition Research*. 15(3), 219-231.
- Huang, L., Xiang, Y., Cai, J., Jiang, L., Lv, Z., Zhang, Y. & Xu, Z. (2011). Effects of three main sugars in cane molasses on the production of butyric acid with *Clostridium tyrobutyricum*. *Korean Journal of Chemical Engineering*. 28(12), 2312-2315.

- Huang, Z.W., Laurent, V., Chetouani, G., Ljubimova, J.Y., Holler, E., Benvegna, T., Loyer, P. & Cammas-Marion, S., (2012). New functional degradable and bio-compatible nanoparticles based on poly (malic acid) derivatives for site-specific anti-cancer drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*. 423, 84-92.
- Kawagoe, M., Hyakumura, K., Suye, Sh., Miki, K. & Naoe, K. (1997). Application of bubble column fermentors to submerged culture of *Schizophyllum commune* for production of l-malic acid. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 84, 333-336.
- Khan, I., Nazir, K., Wang, Z.P., Liu, G.L. & Chi, Z.M. (2014). Calcium malate overproduction by *Penicillium viticola* 152 using the medium containing corn steep liquor. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 98, 1539–1546.
- Knuf, C., Nookaew, I., Brown, S., McCulloch, M., Berry, A. & Nielsen, J. (2013). Investigation of malic acid production in *Aspergillus oryzae* under nitrogen starvation conditions. *Applied and Environmental Microbiology*. 79, 6050–6058.
- Lameloise, M.L., Matinier, H. & Fargues, C. (2009). Concentration and purification of malate ion from a beverage industry wastewater using electrodialysis with homopolar membranes. *Journal of Membrane Science*. 343, 73–81.
- Li, H., Jiang, Z., Yang, X., Yu, L., Zhang, G., Wu, J. & Liu, X.Y. (2015). Sustainable resource opportunity for cane molasses: Use of cane molasses as a grinding aid in the production of Portland cement. *Journal of Cleaner Production*. 93, 56-64.
- Li, X., Liu, Y., Yang, Y., Zhang, H., Wang, H., Wu, Y., Zhang, M., Sun, T., Cheng, J., Wu, X., Pan, L., Jiang, S. & Wu, H. (2014). High levels of malic acid production by the bioconversion of corn straw hydrolyte using an isolated *Rhizopus delemar* strain. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 19, 478-492.
- Liu, G.L., Zhou, Y., Luo, H.P., Cheng, X., Zhang, R.D. & Teng, W.K., (2015). A comparative evaluation of different types of microbial electrolysis desalination cells for malic acid production. *Bioresource Technology*. 198, 87–93.

- Liu, S. & Steinbuchel, A. (1996). Investigation of poly(-L-malic acid) production by strains of *Aureobasidium pullulans*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 46, 273–278.
- Liu, Y.P., Zheng, P., Sun, Z.H., Ni, Y., Dong, J.J. & Zhu, L.L. (2008). Economical succinic acid production from cane molasses by *Actinobacillus succinogenes*. *Bioresource Technology*. 99, 1736–1742.
- Lumyong, S. & Tomita, F. (1993). L-malic acid production by an albino strain of *Monascus araneosus*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 9(3), 383–384.
- Marais, S., Gouanvé, F., Bonnesoeur, A., Grenet, J., Poncin-Epaillard, F., Morvan, C. & Métayer, M. (2005). Unsaturated polyester composites reinforced with flax fibers: effect of cold plasma and autoclave treatments on mechanical and permeation properties, *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing*. 36, 975-986.
- Miller, G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*. 31(3), 366-380.
- Moon, S.Y., Hong, S.H., Kim, T.Y. & Lee, S.Y. (2008). Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of malic acid. *Biochemical Engineering Journal*. 40(2), 312-320.
- Mondala, A.H. (2015). Direct fungal fermentation of lignocellulosic biomass into itaconic, fumaric, and malic acids: current and future prospects. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 42, 487–506.
- Mu, L. & Wen, J.P. (2013). Engineered *Bacillus subtilis* 168 produces L-malate by heterologous biosynthesis pathway construction and lactate dehydrogenase deletion. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 29(1), 33–41.
- Murray, R.K., Bender, D.A., Botham, K.M., Kenhelly, P.J., Rodwell, V.W. & Weil, P.A. (2012). The Pentose phosphate pathway & other pathways of hexose metabolism. *Harper's Illustrated Biochemistry*, 29. China: The McGraw-Hill Companies, Inc.

- Nakayama, S., Tabata, K., Oba, T., Kusumoto, K., Mitsui, S., Kadokura, T. & Nakazato, A. (2012). Characteristics of the high malic acid production mechanism in *Saccharomyces cerevisiae* sake yeast strain No. 28. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 114(3), 281-285.
- Ochsenreither, K., Fischer, C., Neumann, A. & Syltatk, C. (2014). Process characterization and influence of alternative carbon sources and carbon-to-nitrogen ratio on organic acid production by *Aspergillus oryzae* DSM1863. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 98, 5449–5460.
- Odom, T.W., Huang, J.L., Kim, P. & Lieber, C.M. (1998). Atomic structure and electronic properties of single-walled carbon nanotubes. *Nature*. 391, 62-64.
- Olsen, J.A. & Olsen, R.J. (1991). The enzyme catalyzed hydration of fumaric acid to form malic acid. *Journal of Chemical Education*. 68, 436-437.
- Ortiz, R.W.P., Beninca, C., Cardozo-Filho, L. & Zanoelo, E.F. (2017). High-pressure acid-catalyzed isomerization and hydration of fumaric acid in a homogeneous nonisothermal batch reactor. *Industrial and Engineering Chemistry Research*. 56, 3873–3879.
- Oswald, F., Dorsam, S., Veith, N., Zwick, M., Neumann, A., Ochsenreither, K. & Syltatk, C. (2016). Sequential mixed cultures: from syngas to malic acid. *Frontiers in Microbiology*. doi: 10.3389/fmicb.2016.00891.
- Papadaki, A., Papapostolou, H., Alexandri, M., Kopsahelis, N., Papanikolaou, S., Castro, A.M.D., Freire, D.M.G. & Koutinas, A.A. (2017). Fumaric acid production using renewable resources from biodiesel and cane sugar production processes. *Environmental Science and Pollution Research*. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-1791-y>.
- Palmqvist, E. & Hahn-Hagerdal, B. (2000). Fermentation of lignocellulose hydrolysates. I: Inhibition and detoxification. *Bioresource Technology*. 74, 17–24.
- Park, H.G., Kim, T.W., Chae, M.Y. & Yoo, I.K. (2007). Activated carbon-containing alginate adsorbent for the simultaneous removal of heavy metals and toxic organics. *Process Biochemistry*. 42, 1371-1377.

- Rao, G.P., Lu, C. & Su, F. (2007). Sorption of divalent metal ions from aqueous solution by carbon nanotubes: A review. *Separation and Purification Technology*. 58, 224-231.
- Sauer, M., Mattanovich, D., Porro, D. & Branduardi, P. (2008). Microbial production of organic acids: Expanding the markets. *Trends in Biotechnology*. 26, 100–108.
- Su, J., Wang, T., Wang, Y., Li, Y.Y. & Li, H. (2014). The use of lactic acid-producing, malic acid- producing, or malic acid- degrading yeast strains for acidity adjustment in the wine industry. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 98, 2395-2413.
- Taing, O. & Taing, K. (2007). Production of malic and succinic acids by sugar-tolerant yeast *Zygosaccharomyces rouxii*. *European Food Research and Technology*. 224(3), 343-347.
- The Daily Records. (2017). *Top 10 largest sugarcane producing countries in the world*. Retrieved December 19, 2017, from TheDailyRecords Web site: <http://www.thedailyrecords.com/2018-2019-2020-2021/world-famous-top-10-list/world/largest-sugarcane-producing-countries-world-sugar/6560/>
- Torkashvnad, A.M., Hashemabadi, D., Kaviani, B. & Hoor, Sh.S. (2009). Cane Molasses: An ammonia suppressant in the composting manure and municipal wastes. *Research Journal of Environmental Sciences*. 3(5), 567-573.
- Üçer, A., Uyanik, A. & Aygün, S.F. (2006). Adsorption of Cu(II), Cd(II), Zn(II), Mn(II) and Fe(III) ions by tannic acid immobilised activated carbon. *Separation and Purification Technology*. 47, 113-118.
- Van Scott, E.J., Yu, R., (1984). Hyperkeratinization, corneocyte cohesion, and alpha hydroxy acids. *American Academy of Dermatology*. 11(5), 867-879.
- Vert, M. (1998). Chemical routes to poly(-malic acid) and potential applications of this water-soluble bioresorbable poly(-hydroxyalkanoate). *Polymer Degradation and Stability*. 59, 169–175.

- Wang, Z.P., Wang, G.Y., Khan, I. & Chi, Z.M. (2013). High-level production of calcium malate from glucose by *Penicillium sclerotiorum* K302. *Bioresource Technology*. 143, 674-677.
- Wei, P., Cheng, C., Lin, M., Zhou, Y. & Yang, S.T. (2017). Production of poly(malic acid) from sugarcane juice in fermentation by *Aureobasidium pullulans*: Kinetics and process economics. *Bioresource Technology*. 224, 581–589.
- Wenninger, J.A. & McEwen, G.N. (1997). International Cosmetic Ingredient Dictionary and Handbook, 7th edition, Vol 1-2. Washington DC: Cosmetic, Toiletry and Fragrance Association. 775-1289.
- Werpy, T., Petersen, G., Aden, A., Bozell, J., Holladay, J., White, J., Manheim, A., Eliot, D., Lasure, L., & Jones, S. (2004). Top value added chemicals from biomass volume I—results of screening for potential candidates from sugars and synthesis gas. *Pacific Northwest National Laboratory, National Renewable Energy Laboratory and Department of Energy*, Washington, DC. p.76.
- West, T.P. (2011). Malic acid production from thin stillage by *Aspergillus* species. *Biotechnology Letters*. 33, 2463–2467.
- West, T.P. (2017). Microbial production of malic acid from biofuel-related coproducts and biomass. *Fermentation*. 14(3), 1-10.
- Xu, K. & Xu, P. (2014). Efficient production of L-lactic acid using co-feeding strategy based on cane molasses/glucose carbon sources. *Bioresource Technology*. 153, 23-29.
- Yang, L., Lubeck, M. & Lubeck, P.S. (2017). *Aspergillus* as a versatile cell factory for organic acid production. *Fungal Biology Reviews*. 31, 33-49.
- Yanagisawa, H., Matsumoto, Y. & Machida, M. (2010). Adsorption of Zn(II) and Cd(II) ions onto magnesium and activated carbon composite in aqueous solution. *Applied Surface Science*. 256, 1619-1623.
- Ye, X.T., Honda, K., Morimoto, Y., Okano, K. & Ohtake, H. (2013). Direct conversion of glucose to malate by synthetic metabolic engineering. *Journal of Biotechnology*. 164(1), 34–40.

- Yin, X., Li, J., Shin, H.D., Du, G., Liu, L. & Chen, J. (2015). Metabolic engineering in the biotechnological production of organic acids in the tricarboxylic acid cycle of microorganisms: Advances and prospects. *Biotechnology Advances*. 33, 830–841.
- Zambanini, T., Kleineberg, W., Sarikaya, E., Buescher, G.M., Meurer, G., Wierckx, N. & Blank, L.M. (2016). Enhanced malic acid production from glycerol with high-cell density *Ustilago trichophora* TZ1 cultivations. *Biotechnology for Biofuels*. 135(9). 1-10.
- Zelle, R.M., Hulster, E.D., Winden, W.A.V., Waard, P.D., Dijkema, C., Winkler, A.A., Geertman, J.M.A., Dijken, J.P.V., Pronk, J.T. & Maris, A.J.A.V. (2008). Malic Acid Production by *Saccharomyces cerevisiae*: Engineering of pyruvate carboxylation, oxaloacetate reduction, and Malate Export. *Applied And Environmental Microbiology*. 74(9), 2766–2777.
- Zhang, T., Ge, C.Y., Deng, L., Tan, T.W. & Wang, F. (2015). C4-dicarboxylic acid production by overexpressing the reductive TCA pathway. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters*. 362(9).
doi: 10.1093/femsle/fnv052.
- Zhang, X., Wang, X., Shanmugam, K.T. & Ingram, L.O. (2011). L-malate production by metabolically engineered *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*. 77(2), 427-434.
- Zhou, X., Wu, Q., Cai, Z. & Zhang, J. (2000). Studies on the correlation between production of L-malic acid and some cytosolic enzymes in the L-malic acid producing strain *Aspergillus* sp. N1-14. *Acta microbiologica Sinica*. 40, 500–506.
- Zou, X., Zhou, Y. & Yang, S.T. (2013). Production of polymalic acid and malic acid by *Aureobasidium pullulans* fermentation and acid hydrolysis. *Biotechnology and Bioengineering*. 110(8). 2105-2113.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

ก.1 สูตรอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียไอโซเลต AG2

ก.1.1 อาหารสูตร Selective medium (Tabushi และคณะ, 1981)

Glucose	100	กรัมต่อลิตร
Yeast extract	5	กรัมต่อลิตร
KH_2PO_4	1.0	กรัมต่อลิตร
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.5	กรัมต่อลิตร
CaCO_3	10.0	กรัมต่อลิตร

ก.1.2 อาหารสูตร Basic medium (Li และคณะ, 2014)

Glucose	100	กรัมต่อลิตร
KH_2PO_4	0.8	กรัมต่อลิตร
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2.0	กรัมต่อลิตร
MgSO_4	0.3	กรัมต่อลิตร
ZnSO_4	0.2	กรัมต่อลิตร
CaCO_3	30	กรัมต่อลิตร

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารละลายสำหรับการวิเคราะห์ทางเคมี

ข.1 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธีดีเอ็นเอส (Miller, 1959)

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

ชั่งสาร 3,5-dinitrosalicylic 10 กรัมละลายในน้ำกลั่น 250 มิลลิลิตร เติมสารละลายต่างที่ละน้อย (โซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 2 โมลาร์ เตรียมโดยชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 16 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร) จนให้สารละลายเข้ากันจนหมด จนกระทั่งได้สารละลายใส จึงเติมโพแทสเซียมทาทาลงไปที่ละน้อยจนครบ 300 กรัม แล้วทำการปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 1000 มิลลิลิตร

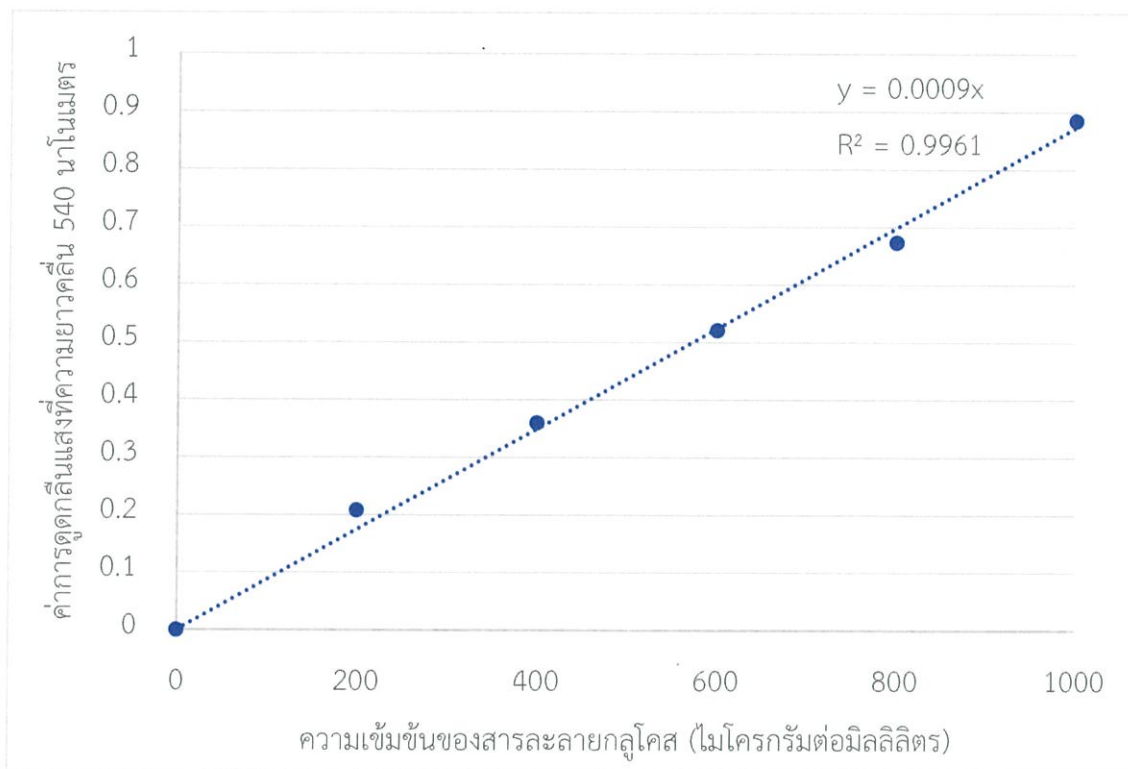
ข.1.2 การเตรียมสารละลายกลูโคสมาตรฐานเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ปริมาตร 100 มิลลิลิตร)

อบกลูโคสที่ตู้อบ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในเดซิเคเตอร์ ชั่งกลูโคสที่ผ่านการอบมา 0.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตรเล็กน้อย แล้วทำการปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสตั้งต้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นจึงเจือจางสารละลายกลูโคสมาตรฐานด้วยน้ำกลั่นดังตารางที่ ข.1

ตารางที่ ข.1 แสดงการเตรียมสารละลายกลูโคสมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ปริมาตรของสารละลายกลูโคสเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (มิลลิลิตร)	ปริมาตรของน้ำกลั่น (มิลลิลิตร)	ความเข้มข้นของสารละลายสุดท้าย (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)
-	5	0
5	4	200
4	3	400
3	2	600
2	1	800
1	-	1000

จากนั้นทำการเตรียมกราฟมาตรฐานกลูโคส โดยนำสารละลายกลูโคสที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่เตรียมไว้ วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธีดีเอนเอส โดยใช้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ได้ดังรูปที่ ข.1



รูปที่ ข.1 แสดงกราฟสารละลายกลูโคสมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

ข.2 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธีฟินอล-ซัลฟูริก (Dubois และคณะ, 1956)

ข.2.1 การเตรียมสารละลายฟินอล (Phenol) เข้มข้นร้อยละ 5 โดยมวลต่อปริมาตร (ปริมาตร 500 มิลลิลิตร)

สารละลายฟินอล 100 มิลลิลิตร มีฟินอลอยู่ประมาณ 5 กรัม

$$\begin{aligned} \text{ดังนั้นสารละลายฟินอล 500 มิลลิลิตร จะมีฟินอลอยู่} & \frac{5 \text{ กรัม}}{100 \text{ มิลลิลิตร}} \times 500 \text{ มิลลิลิตร} \\ & = 25 \text{ กรัม} \end{aligned}$$

ชั่งฟีนอล 25 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร คนให้ฟีนอลละลายหมด จนกระทั่งได้สารละลายใส แล้วทำการปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 500 มิลลิลิตร ข้อควรระวัง ในการเตรียมสารละลายฟีนอล ควรเตรียมสารละลายฟีนอลในตู้ดูดควันพร้อมทั้งใส่ถุงมือเพื่อ ป้องกันอันตรายจากสารเคมี

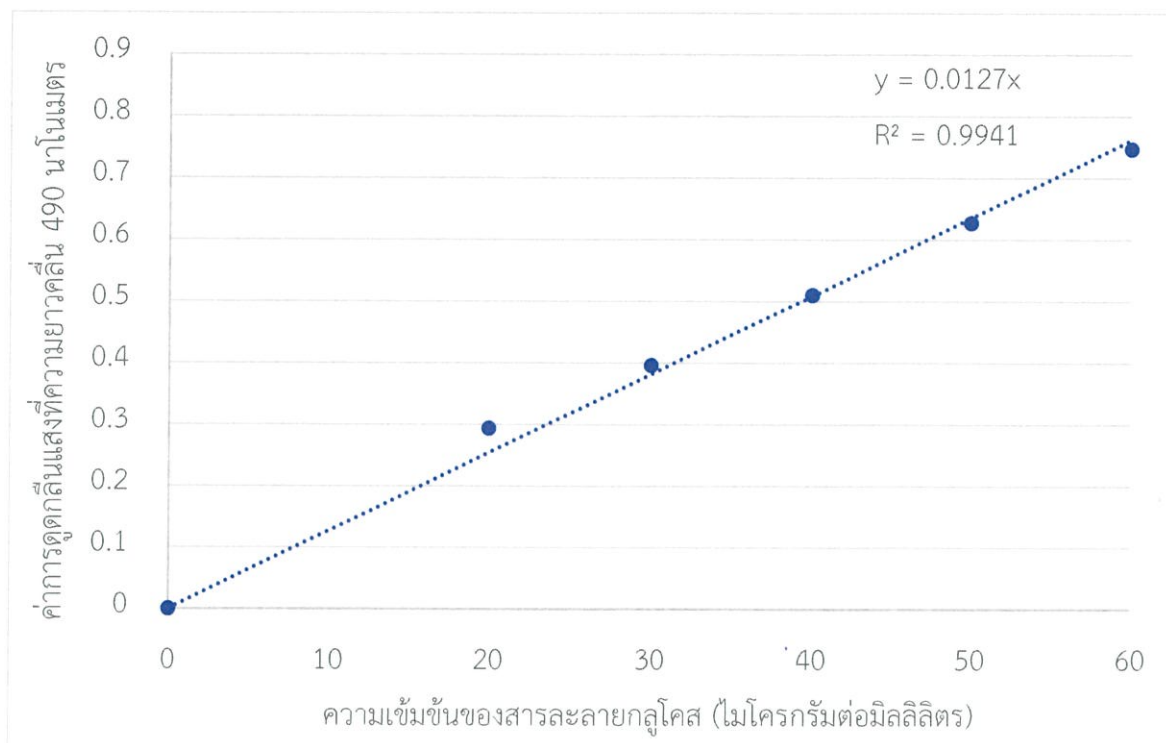
ข.2.2 การเตรียมสารละลายกลูโคสมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0, 20, 30, 40, 50 และ 60 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ทำการเจือจางสารละลายกลูโคสเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (เตรียมจาก ข.1.2) ดังตารางที่ ข.2

ตารางที่ ข.2 แสดงการเตรียมสารละลายกลูโคสมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ปริมาณของสารละลายกลูโคสเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (มิลลิลิตร)	ปริมาณของน้ำกลั่น (มิลลิลิตร)	ความเข้มข้นของสารละลาย สุดท้าย (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)
-	5.0	0
0.1	4.9	20
0.2	4.8	40
0.3	4.7	60
0.4	4.6	80
0.5	4.5	100

จากนั้นทำการเตรียมกราฟมาตรฐานกลูโคส โดยนำสารละลายกลูโคสที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่เตรียมไว้ วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธีฟีนอล-ซัลฟูริก โดยใช้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร ได้ดังรูปที่ ข.2



รูปที่ ข.2 แสดงกราฟสารละลายกลูโคสมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด

ข.3 การวิเคราะห์ปริมาณแคลเซียมมาเลตด้วยวิธีการไทเทรต (FAO, 2006)

ข.3.1 การเตรียมสารละลายกรดเอทิลีนไดอะมีนเตตระอะซิติก (Ethylenediamine-tetraacetic acid, EDTA) เข้มข้น 5 โมลาร์ (ปริมาตร 1 ลิตร)

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

โดย g คือ ปริมาณ EDTA, C คือ ความเข้มข้นของสารละลาย EDTA, V คือ ปริมาตรสารละลาย EDTA และ MW คือ มวลโมเลกุลของ EDTA เท่ากับ 372.24 กรัมต่อโมล

$$\begin{aligned} \text{แทนค่าตามสูตร} \quad \frac{g}{372.24 \text{ กรัมต่อโมล}} &= (0.05 \text{ โมลต่อลิตร})(1 \text{ ลิตร}) \\ g &= 18.612 \text{ กรัม} \end{aligned}$$

ดังนั้นปริมาณ EDTA ที่ใช้เท่ากับ 18.612 กรัม

ชั่ง EDTA 18.612 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 300 มิลลิลิตร คนให้ EDTA ละลายหมด จนกระทั่งได้สารละลายใส แล้วทำการปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 1 ลิตร

ข.3.2 การเตรียมสารละลายกรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid, HCl) เข้มข้น 3.1 โมลาร์ (ปริมาตร 1 ลิตร)

$$\text{จากสูตร} \quad C = \frac{10dx}{MW}$$

โดย C คือความเข้มข้นของสารละลายกรดไฮโดรคลอริก, d คือ ความหนาแน่นของสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเท่ากับ 1.18 กรัมต่อมิลลิลิตร, x คือ ร้อยละความเข้มข้นของสารละลายกรดไฮโดรคลอริก เท่ากับ 36 และ MW คือ มวลโมเลกุลของกรดไฮโดรคลอริก เท่ากับ 36.46 กรัมต่อโมล

$$\begin{aligned} \text{แทนค่าตามสูตร} \quad C &= \frac{(10)(1.18 \text{ กรัมต่อมิลลิลิตร})(36)}{36.46 \text{ กรัมต่อโมล}} \\ C &= 11.65 \text{ โมลาร์} \end{aligned}$$

ดังนั้นสารละลายกรดไฮโดรคลอริกร้อยละ 36 โดยมวล มีความเข้มข้นเท่ากับ 11.65 โมลาร์

$$\text{จากสูตร} \quad C_1V_1 = C_2V_2$$

โดย C_1 คือ ความเข้มข้นของสารละลายตั้งต้น เท่ากับ 11.65 โมลาร์, V_1 คือ ปริมาตรของสารละลายตั้งต้นที่ใช้, C_2 คือ ความเข้มข้นของสารละลายสุดท้าย และ V_2 คือ ปริมาตรสารละลายสุดท้าย เท่ากับ 1 ลิตร

$$\begin{aligned} \text{แทนค่าตามสูตร} \quad (11.65 \text{ โมลาร์})V_1 &= (3.1 \text{ โมลาร์})(1 \text{ ลิตร}) \\ V_1 &= 0.2661 \text{ ลิตร} \\ &= 266 \text{ มิลลิลิตร} \end{aligned}$$

ดังนั้นปริมาณสารละลายกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ เท่ากับ 266 มิลลิลิตร

เตรียมน้ำกลั่นปริมาตร 500 มิลลิลิตร จากนั้นค่อย ๆ เทสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นร้อยละ 36 โดยมวล ปริมาตร 266 มิลลิลิตร อย่างช้า ๆ พร้อมทั้งคนตลอดเวลา แล้วทำการปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 1 ลิตร ข้อควรระวังในการเตรียมสารละลายกรดไฮโดรคลอริก ควรเตรียมในตู้ดูดควันพร้อมทั้งใส่ถุงมือเพื่อป้องกันอันตรายจากสารเคมี

ข.3.3 การเตรียมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide, NaOH) เข้มข้น 1.075 โมลาร์ (ปริมาตร 1 ลิตร)

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

โดย g คือ ปริมาณโซเดียมไฮดรอกไซด์, C คือ ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์, V คือ ปริมาตรสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ และ MW คือ มวลโมเลกุลของ โซเดียมไฮดรอกไซด์ เท่ากับ 40 กรัมต่อโมล

$$\begin{aligned} \text{แทนค่าตามสูตร} \quad \frac{g}{40 \text{ กรัมต่อโมล}} &= (1.075 \text{ โมลต่อลิตร})(1 \text{ ลิตร}) \\ g &= 43 \text{ กรัม} \end{aligned}$$

ดังนั้นปริมาณโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้เท่ากับ 43 กรัม

ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 43 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 300 มิลลิลิตร คนให้โซเดียมไฮดรอกไซด์ละลายหมดจนกระทั่งได้สารละลายใส แล้วทำการปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 1 ลิตร

ตารางที่ ข.3 แสดงปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือเมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียไอโซเลต AG2 ในอาหารสูตร basic medium โดยใช้กากน้ำตาลที่ทำการปรับสภาพ ด้วยวิธีที่แตกต่างกันเป็นแหล่งคาร์บอน

แหล่งกากน้ำตาล	วิธีการปรับสภาพ	เวลา (วัน)	ค่าพีเอช	ระดับการเจือจาง	ค่าการดูดกลืนแสง			ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)			ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือเฉลี่ย (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ใช้ (กรัมต่อลิตร)	แคลเซียมมาเลต (กรัมต่อลิตร)	ผลได้ (กรัมต่อกรัม น้ำตาลทั้งหมด)	อัตราการผลิต (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)
					0.209	0.203	0.210								
โรงงานมิตรผล	ไม่ปรับสภาพ	0	5.65	10000	0.209	0.203	0.210	164.57	159.84	165.35	163.25 ± 2.98	61.89	16.12 ± 0.22	0.26 ± 0.00	0.11 ± 0.00
		2	5.81	2000	0.556	0.575	0.581	87.56	90.55	91.50	89.87 ± 2.06				
		4	6.31	2000	0.626	0.630	0.613	98.58	99.21	96.54	98.11 ± 1.40				
		6	6.68	2000	0.651	0.638	0.642	102.52	100.47	101.10	101.36 ± 1.05				
	ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกและแคลเซียมไฮดรอกไซด์	0	5.71	10000	0.221	0.227	0.220	174.02	178.74	173.23	175.33 ± 2.98	87.87	19.99 ± 0.56	0.23 ± 0.01	0.14 ± 0.00
		2	5.88	2000	0.510	0.484	0.495	80.31	76.22	77.95	78.16 ± 2.06				
		4	6.55	2000	0.504	0.524	0.540	79.37	82.52	85.04	82.31 ± 2.84				
		6	6.79	2000	0.566	0.540	0.560	89.13	85.04	88.19	87.45 ± 2.14				
	ปรับสภาพด้วยถ่านกัมมันต์	0	5.41	10000	0.262	0.267	0.283	206.30	210.24	222.83	213.12 ± 8.64	86.25	15.94 ± 1.53	0.18 ± 0.02	0.11 ± 0.01
		2	5.52	2000	0.788	0.775	0.800	124.09	122.05	125.98	124.04 ± 1.97				
		4	5.79	2000	0.775	0.762	0.822	122.05	120.00	129.45	123.83 ± 4.97				
		6	6.03	2000	0.750	0.825	0.842	118.11	129.92	132.60	126.88 ± 7.71				
โรงงานวังขนาย	ไม่ปรับสภาพ	0	5.42	10000	0.238	0.241	0.238	171.22	173.38	171.22	171.94 ± 1.25	90.12	20.08 ± 0.26	0.22 ± 0.00	0.14 ± 0.00
		2	5.70	2000	0.657	0.671	0.650	94.53	96.55	93.53	94.87 ± 1.54				
		4	5.96	2000	0.654	0.669	0.650	94.10	96.26	93.53	94.63 ± 1.44				
		6	6.16	2000	0.573	0.562	0.571	82.45	80.86	82.16	81.82 ± 0.84				
	ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกและแคลเซียมไฮดรอกไซด์	0	5.68	10000	0.214	0.216	0.215	153.96	155.40	154.68	154.68 ± 0.42	86.47	17.69 ± 0.26	0.20 ± 0.00	0.12 ± 0.00
		2	5.94	2000	0.584	0.573	0.572	84.03	82.45	82.30	82.93 ± 0.33				
		4	6.39	2000	0.506	0.479	0.511	72.81	68.92	73.53	71.75 ± 2.32				
		6	6.33	2000	0.478	0.465	0.479	68.78	66.91	68.92	68.20 ± 1.02				
	ปรับสภาพด้วยถ่านกัมมันต์	0	5.48	10000	0.201	0.204	0.216	144.60	146.76	155.40	148.92 ± 4.49	78.27	15.65 ± 0.59	0.20 ± 0.01	0.11 ± 0.00
		2	5.49	2000	0.720	0.715	0.716	103.60	102.88	103.02	103.17 ± 0.14				
		4	6.36	2000	0.513	0.500	0.495	73.81	71.94	71.22	72.33 ± 0.56				
		6	6.39	2000	0.489	0.473	0.511	70.36	68.06	73.53	70.65 ± 2.74				

ตารางที่ ข.4 แสดงปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือเมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียไอโซเลต AG2 ในอาหารสูตร basic medium โดยใช้แหล่งคาร์บอนเป็นกากน้ำตาลที่ทำการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกที่ค่าพีเอชแตกต่างกัน

ค่าพีเอช	เวลา (วัน)	ค่าพีเอช	ระดับการเจือจาง	ค่าการดูดกลืนแสง			ปริมาณน้ำตาลกลีโคไซด์ที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)			ปริมาณน้ำตาลกลีโคไซด์ที่เหลือเฉลี่ย (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลกลีโคไซด์ที่ใช้ (กรัมต่อลิตร)	แคลเซียมมาเลต (กรัมต่อลิตร)	ผลได้ (กรัมต่อกรัมน้ำตาลกลีโคไซด์)	อัตราการผลิต (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)
				0.641	0.637	0.615	142.44	141.56	136.67					
1.0	0	5.55	200	0.641	0.637	0.615	142.44	141.56	136.67	140.22 ± 3.11	55.33	29.84 ± 0.94	0.54 ± 0.02	0.20 ± 0.01
	2	5.63	200	0.470	0.493	0.495	104.44	109.56	110.00	108.00 ± 3.09				
	4	5.60	200	0.383	0.382	0.375	85.11	84.89	83.33	84.44 ± 0.97				
	6	5.79	200	0.379	0.386	0.381	84.22	85.78	84.67	84.89 ± 0.80				
2.0	0	5.49	200	0.610	0.615	0.629	135.56	136.67	139.78	137.33 ± 2.19	52.89	28.70 ± 0.69	0.54 ± 0.01	0.20 ± 0.01
	2	5.64	200	0.506	0.526	0.514	112.44	116.89	114.22	114.52 ± 2.24				
	4	5.51	200	0.381	0.384	0.373	84.67	85.33	82.89	84.30 ± 1.26				
	6	5.76	200	0.374	0.381	0.385	83.11	84.67	85.56	84.44 ± 1.24				
3.0	0	5.52	200	0.428	0.426	0.425	95.11	94.67	94.44	94.74 ± 0.34	33.30	24.46 ± 0.83	0.73 ± 0.03	0.17 ± 0.01
	2	5.70	100	0.608	0.628	0.611	67.56	69.78	67.89	68.41 ± 1.20				
	4	5.90	100	0.559	0.580	0.570	62.11	64.44	63.33	63.30 ± 1.17				
	6	5.93	100	0.556	0.553	0.550	61.78	61.44	61.11	61.44 ± 0.33				

ตารางที่ ข.5 แสดงปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือเมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียไอโซเลต AG2 ในอาหารสูตร basic medium โดยใช้แหล่งไนโตรเจนเป็นแอมโมเนียม

ซัลเฟตในปริมาณที่แตกต่างกัน

ปริมาณของ แหล่งไนโตรเจน (กรัมต่อลิตร)	เวลา (วัน)	ค่าพีเอช	ระดับการเจือจาง	ค่าดูดกลืนแสง			ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)			ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ที่เหลือเฉลี่ย (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลที่ใช้	แคลเซียมมาเลต (กรัม ต่อลิตร)	ผลได้ (กรัมต่อกรัม น้ำตาลรีดิวซ์)	อัตราการผลิต (กรัมต่อลิตร ต่อชั่วโมง)
				0.482	0.490	0.506	107.11	108.89	112.44					
0.00	0	5.41	200	0.482	0.490	0.506	107.11	108.89	112.44	109.48 ± 2.72	39.85	25.11 ± 0.19	0.66 ± 0.01	0.17 ± 0.00
	2	5.28	200	0.354	0.371	0.367	78.67	82.44	81.56	80.89 ± 1.98				
	4	5.59	200	0.326	0.344	0.340	72.44	76.44	75.56	74.81 ± 2.10				
	6	5.67	200	0.299	0.324	0.317	66.44	72.00	70.44	69.63 ± 2.87				
1.00	0	5.54	200	0.502	0.513	0.522	111.56	114.00	116.00	113.85 ± 2.23	42.15	24.69 ± 0.59	0.61 ± 0.01	0.17 ± 0.00
	2	5.43	200	0.386	0.371	0.382	85.78	82.44	84.89	84.37 ± 1.73				
	4	5.68	200	0.309	0.322	0.327	68.67	71.56	72.67	70.96 ± 2.06				
	6	5.65	200	0.317	0.319	0.332	70.44	70.89	73.78	71.70 ± 1.81				
2.00	0	5.58	200	0.417	0.402	0.403	92.67	89.33	89.56	90.52 ± 1.86	22.81	24.00 ± 0.24	1.10 ± 0.01	0.17 ± 0.00
	2	5.46	200	0.361	0.347	0.352	80.22	77.11	78.22	78.52 ± 1.58				
	4	5.72	200	0.333	0.337	0.350	74.00	74.89	77.78	75.56 ± 1.98				
	6	5.72	200	0.300	0.304	0.310	66.67	67.56	68.89	67.70 ± 1.12				
4.00	0	5.68	200	0.471	0.469	0.464	104.67	104.22	103.11	104.00 ± 0.80	39.56	22.29	0.59	0.15
	2	5.56	200	0.366	0.364	0.366	81.33	80.89	81.33	81.19 ± 0.26				
	4	5.83	200	0.285	0.290	0.298	63.33	64.44	66.22	64.67 ± 1.46				
	6	5.77	200	0.291	0.293	0.286	64.67	65.11	63.56	64.44 ± 0.80				

ภาคผนวก ค

การวิเคราะห์ทางสถิติ

ตารางที่ ค.1 การวิเคราะห์ค่าทางสถิติของปริมาณแคลเซียมมาเลต ค่าผลได้ และอัตราการผลิต
 กรดมาลิกจากกากน้ำตาลที่ทำการปรับสภาพด้วยวิธีแตกต่างกันโดยแบคทีเรีย
 ไอโซเลต AG2

ANOVA						
		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
แคลเซียมมาเลต	Between Groups	31.436	2	15.718	17.739	0.003
	Within Groups	5.317	6	0.886		
	Total	36.753	8			
ผลได้	Between Groups	0.008	2	0.004	26.000	0.001
	Within Groups	0.001	6	0.000		
	Total	0.009	8			
อัตราการผลิต	Between Groups	0.002	2	0.001	27.000	0.001
	Within Groups	0.000	6	0.000		
	Total	0.002	8			

ตารางที่ ค.2 แสดงการเปรียบเทียบปริมาณแคลเซียมมาเลต ผลได้ และอัตราการผลิตรวมจาก
 กากน้ำตาลที่ทำการปรับสภาพด้วยวิธีแตกต่างกันโดยแบคทีเรียไอโซเลต AG2 ด้วย
 วิธี Duncan ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

แคลเซียมมาเลต (กรัมต่อลิตร)			
Duncan ^a			
วิธีการปรับสภาพ	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
ปรับสภาพด้วยถ่านกัมมันต์	3	15.9433	
ไม่ปรับสภาพ	3	16.1200	
ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริก และแคลเซียมไฮดรอกไซด์	3		19.9933
Sig.		0.826	1.000

ผลได้ (กรัมต่อกรัมน้ำตาลทั้งหมด)				
Duncan ^a				
วิธีการปรับสภาพ	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
ปรับสภาพด้วยถ่านกัมมันต์	3	0.1867		
ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริก และแคลเซียมไฮดรอกไซด์	3		0.2267	
ไม่ปรับสภาพ	3			0.2600
Sig.		1.000	1.000	1.000

อัตราการผลิต (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)			
Duncan ^a			
วิธีการปรับสภาพ	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
ไม่ปรับสภาพ	3	0.1100	
ปรับสภาพด้วยถ่านกัมมันต์	3	0.1100	
ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริก และแคลเซียมไฮดรอกไซด์	3		0.1400
Sig.		1.000	1.000

ตารางที่ ค.3 การวิเคราะห์ค่าทางสถิติของปริมาณแคลเซียมมาเลต ค่าผลได้ และอัตราการผลิตกรดมาลิกที่ได้จากกากน้ำตาลที่ทำการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกที่ค่าพีเอชแตกต่างกันโดยแบคทีเรียไอโซเลต AG2

ANOVA						
		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
แคลเซียมมาเลต	Between Groups	48.306	2	24.153	35.211	0.000
	Within Groups	4.116	6	0.686		
	Total	52.422	8			
ผลได้	Between Groups	0.073	2	0.037	114.034	0.000
	Within Groups	0.002	6	0.000		
	Total	0.075	8			
อัตราการผลิต	Between Groups	0.001	2	0.001	22.333	0.002
	Within Groups	0.000	6	0.000		
	Total	0.002	8			

ตารางที่ ค.4 แสดงการเปรียบเทียบปริมาณแคลเซียมมาเลตเลต ค่าผลได้ และอัตราการผลิต
กรดมาลิกจากกากน้ำตาลที่ทำการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกที่ค่าพีเอชแตกต่างกัน
โดยแบบคี่เรย์ไอโซเลต AG2 ด้วยวิธี Duncan ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

แคลเซียมมาเลต (กรัมต่อลิตร)			
Duncan ^a			
ค่าพีเอช	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
3.0	3	24.4567	
2.0	3		28.7033
1.0	3		29.8400
Sig.		1.000	0.144

ผลได้ (กรัมต่อกรัมน้ำตาลรีดิวซ์)			
Duncan ^a			
ค่าพีเอช	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
1.0	3	0.5400	
2.0	3	0.5433	
3.0	3		0.7333
Sig.		0.828	1.000

อัตราการผลิต (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)			
Duncan ^a			
ค่าพีเอช	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
3.0	3	0.1733	
2.0	3		0.1967
1.0	3		0.2033
Sig.		1.000	0.207

ตารางที่ ค.5 การวิเคราะห์ค่าทางสถิติของปริมาณแคลเซียมมาเลต ค่าผลได้ และอัตราการผลิต
กรดมาลิกจากการใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ปริมาณแตกต่างกัน
โดยแบคทีเรียไอโซเลต AG2

ANOVA						
		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
แคลเซียมมาเลต	Between Groups	13.848	3	4.616	2.663	0.119
	Within Groups	13.870	8	1.734		
	Total	27.718	11			
ผลได้	Between Groups	0.528	3	0.176	143.753	0.000
	Within Groups	0.010	8	0.001		
	Total	0.538	11			
อัตราการผลิต	Between Groups	0.001	3	0.000	1.844	0.217
	Within Groups	0.001	8	0.000		
	Total	0.002	11			

ตารางที่ ค.6 แสดงการเปรียบเทียบปริมาณแคลเซียมมาเลตค่าผลได้ และอัตราการผลิตกรดมาลิกจากการใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ปริมาณแตกต่างกันโดยแบคทีเรียไอโซเลต AG2 ด้วยวิธี Duncan ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

แคลเซียมมาเลต (กรัมต่อลิตร)			
Duncan ^a			
ปริมาณแหล่งไนโตรเจน (กรัมต่อลิตร)	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
4.000	3	22.2933	
2.000	3	23.9967	23.9967
1.000	3	24.6933	24.6933
0.000	3		25.1067
Sig.		0.065	0.351

ผลได้ (กรัมต่อกรัมน้ำตาลรีดิวิซ์)				
Duncan ^a				
ปริมาณแหล่งไนโตรเจน (กรัมต่อลิตร)	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
4.000	3	0.5867		
1.000	3	0.6133	0.6133	
0.000	3		0.6567	
2.000	3			1.1000
Sig.		0.378	0.168	1.000

อัตราการผลิต (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)		
Duncan ^a		
ปริมาณแหล่งไนโตรเจน (กรัมต่อลิตร)	N	Subset for alpha = 0.05
		1
4.000	3	0.1533
2.000	3	0.1667
1.000	3	0.1700
0.000	3	0.1733
Sig.		0.074



งานทะเบียนคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
คำรับรองเล่มโครงการพิเศษ

วันที่ 12 เดือน กรกฎาคม พ.ศ. 2561

ข้าพเจ้า นางสาวนิชา หลุกกุล รหัสประจำตัว 57050756
นางสาวรวงคณา วงศ์อินตา รหัสประจำตัว 57050758

นักศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชา ชีววิทยา

ขอรับรองว่าโครงการพิเศษ เรื่อง

ชื่อภาษาไทย การผลิตกรดมาลิกจากกากน้ำตาลจากอ้อยโดยเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต AG2

ชื่อภาษาอังกฤษ Production of Malic Acid from Sugarcane Molasses by The Bacterium, Isolate AG2

ปีการศึกษา 2560

เป็นผลงานวิจัยที่มีได้คัดลอกหรือละเมิดลิขสิทธิ์ของผู้อื่นและได้ผ่านการตรวจสอบความซ้ำซ้อนเรียบร้อยแล้ว และได้แนบเอกสารการตรวจสอบการลอกเลียนงานวรรณกรรมที่ตรวจสอบจากเล่มโครงการพิเศษ/ปัญหาพิเศษ/สหกิจศึกษาฉบับสมบูรณ์แล้ว

โปรแกรมอักขราวิสุทธิ์ 0.00 %

ลงชื่อ นิชา หลุกกุล

(นางสาวนิชา หลุกกุล)

นักศึกษา

ลงชื่อ รวงคณา วงศ์อินตา

(นางสาวรวงคณา วงศ์อินตา)

นักศึกษา

ข้าพเจ้า ผศ.ดร. สมพิศ สอนโยธา อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการพิเศษ ได้ตรวจสอบโครงการพิเศษของนักศึกษาข้างต้น แล้ว ขอรับรองว่าเป็นผลงานวิจัยของนักศึกษาจริงและมีเนื้อหาสมบูรณ์ จึงลงชื่อไว้เป็นหลักฐาน

ลงชื่อ ดนุช เรืองงาม

(ผศ.ดร.ดวงกมล เรืองงาม)

ประธานกรรมการ

ลงชื่อ อ.ธนาวดี ก่ออนันต์

(อ.ธนาวดี ก่ออนันต์)

กรรมการ

ลงชื่อ สมพิศ สอนโยธา

(ผศ.ดร.สมพิศ สอนโยธา)

อาจารย์ที่ปรึกษา