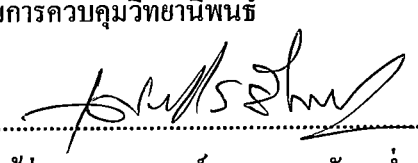
การผลิตกรดซัคซินิคจากกากมันสำปะหลัง

ณัฐพงษ์ ดิฐกุลชัยมงคล

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
มีนาคม 2559
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยบูรพา

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์และคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ได้พิจารณาวิทยานิพนธ์ของ ณัฐพงษ์ ดิฐกุลชัยมงคล ฉบับนี้แล้ว เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม ของมหาวิทยาลัยบูรพาได้

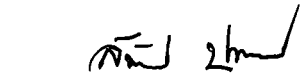
คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์



..... อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก

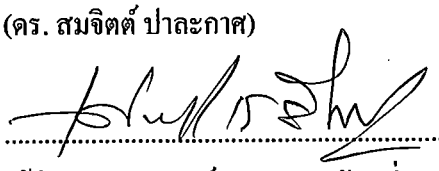
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เศรษฐวัชร ฉ่ำศาสตร์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์



..... ประธาน

(ดร. สมจิตต์ ปาละกาศ)

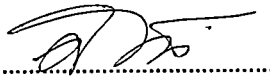


..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เศรษฐวัชร ฉ่ำศาสตร์)

..... กรรมการ

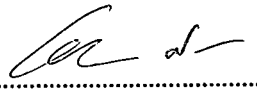
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กรองจันทร์ รัตนประดิษฐ์)



..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศิริโฉม ทุ่งเก้า)

คณะวิทยาศาสตร์อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม ของมหาวิทยาลัยบูรพา



..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เอกรัฐ ศรีสุข)

วันที่ 25 เดือน มิถุนายน พ.ศ. 2559

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี โดยได้รับความเมตตากรุณา การช่วยเหลือและกำลังใจจากหลายบุคคลตลอดช่วงระยะเวลาการศึกษาในครั้งนี้ ผู้วิจัยต้องขอกราบขอบพระคุณบุคคลสำคัญท่านแรก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เศรษฐวัชร ฉ่ำศาสตร์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ท่านเป็นครูผู้สอน ผู้ให้ความรู้ ที่สั่งสอน ให้คำปรึกษา คำแนะนำ ตรวจทาน และแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ด้วยความเอาใจใส่ นับได้ว่าท่านเป็นเบื้องหลังแห่งความสำเร็จในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กรองจันทร์ รัตนประดิษฐ์ กรรมการสอบปากเปล่าวิทยานิพนธ์และเป็นครูอีกหนึ่งท่านที่ให้คำปรึกษา ให้ความช่วยเหลือผู้วิจัยตั้งแต่การศึกษาในระดับปริญญาตรีมาจนปัจจุบัน

ขอขอบพระคุณ ดร. สมจิตต์ ปาละกาศ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศิริโฉม ทุ่งเก้า ประธานกรรมการและกรรมการสอบปากเปล่าวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาเสียสละเวลาและให้คำแนะนำในการแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความถูกต้อง เหมาะสม และสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น งานวิจัยครั้งนี้ได้รับการสนับสนุนจากงบประมาณเงินรายได้ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา และศูนย์ความเป็นเลิศด้านอนามัยสิ่งแวดล้อม พิษวิทยาและการบริหารจัดการสารเคมี ซึ่งต้องขอขอบพระคุณอย่างยิ่ง

ขอบพระคุณ คุณพ่อคุณแม่ คนในครอบครัว และญาติพี่น้องที่ให้การช่วยเหลือ เป็นกำลังใจที่สำคัญในยามที่ล้มเหลว นับเป็นแรงผลักดันให้เกิดความสำเร็จในครั้งนี้

ขอบคุณ น.ส.โสภา เกิดแก้ว ที่เป็นคู่คิด คอยให้ความช่วยเหลือ เป็นกำลังใจที่สำคัญในทุก ๆ เวลา อีกทั้งเพื่อนพ้องน้องพี่ที่มาเยี่ยมเยือน แวะเวียนกันคอยให้กำลังใจเสมอมา มิตรภาพเหล่านี้ผู้วิจัยจะจดจำตลอดไป

และขอบคุณ นายมรกต กระจ่าง น.ส. ขวัญฤทัย มาลัยเรืองและพี่น้องในห้องแล็ป ที่คอยเป็นที่ปรึกษา ให้คำแนะนำ ช่วยเหลือ ตลอดการทำวิจัย ทำให้การวิจัยสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ตลอดจนบริษัท ชอไชยวัฒน์อุตสาหกรรม จำกัด ที่เอื้อเฟื้อวัตถุดิบ เครื่องมือ และอุปกรณ์ในการวิจัย

ความดีทั้งหลายที่ทุกท่านและผู้อื่นที่ไม่ได้กล่าวถึงในที่นี้ ได้ให้ความช่วยเหลือ ให้กำลังใจ ให้ประสบการณ์แก่ผู้วิจัย ซึ่งนำไปสู่การประสบความสำเร็จของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยได้รับอย่างซาบซึ้ง และขอให้ผลจากการ “ให้” นี้ก่อเกิดเป็นผลบุญส่งให้สุขภาพแข็งแรง ชีวิตราบรื่นสมดังปรารถนาทุกประการด้วยเทอญ

ณัฐพงษ์ ดิฐกุลชัยมงคล

54910150: สาขาวิชา: วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม; วท.ม. (วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม)
คำสำคัญ: กรดซัคซินิค/ กากมันสำปะหลัง

ณัฐพงษ์ ดิฐกุลชัยมงคล: การผลิตกรดซัคซินิคจากกากมันสำปะหลัง (SUCCINIC ACID PRODUCTION FROM CASSAVA PULP) คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: เศรษฐวัชร ฉ่ำศาสตร์, Ph.D. 154 หน้า. ปี พ.ศ. 2559.

กรดซัคซินิคสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้อย่างกว้างขวาง เป็นสารตั้งต้นสำหรับการสังเคราะห์สารอื่น ๆ เป็นสารเติมแต่งในอาหารและยา กรดซัคซินิคส่วนใหญ่ผลิตโดยอาศัยกระบวนการทางเคมี โดยใช้วัตถุดิบหลักจากปิโตรเลียม ทำให้กรดซัคซินิคที่ได้มีราคาแพงและเกิดปัญหามลพิษต่อสิ่งแวดล้อม กระบวนการหมักเพื่อผลิตกรดซัคซินิคจากวัตถุดิบทางการเกษตรซึ่งจัดเป็นทรัพยากรหมุนเวียนได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก งานวิจัยครั้งนี้เพื่อศึกษาการผลิตกรดซัคซินิคจากแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากกระเพาะพักของกระบือ โดยศึกษาการผลิตในขวดรูปชมพู่เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า สามารถผลิตกรดซัคซินิคได้ 2.89 กรัมต่อลิตร มีผลผลิตต่อน้ำตาลที่ใช้ไปเท่ากับ 0.14 กรัมต่อกรัม และมีอัตราการผลิตเท่ากับ 0.12 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง เมื่อทดลองเติมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในการผลิต พบว่า ความเข้มข้นของกรดซัคซินิค ผลผลิตต่อน้ำตาลที่ใช้ไปและอัตราการผลิตเพิ่มสูงขึ้นเท่ากับ 6.74 กรัมต่อลิตร 0.45 กรัมต่อกรัม และ 0.28 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ และเมื่อทำการผลิตในถังหมักขนาด 5 ลิตร ซึ่งมีการควบคุมสภาวะที่มีประสิทธิภาพ มีการกวนผสมดี และเติมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์อย่างต่อเนื่อง พบว่า มีผลผลิตต่อน้ำตาลที่ใช้ไปเท่ากับ 0.58 กรัมต่อกรัม และอัตราการผลิตเท่ากับ 2.286 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ซึ่งเมื่อเทียบกับการหมักในขวดรูปชมพู่เพิ่มสูงขึ้นถึง 1.29 และ 8.14 เท่า ตามลำดับ และทำการศึกษาการผลิตกรดซัคซินิคจากกากมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ในถังหมัก โดยทำการหมักแบบหลายกะลำดับต่อเนื่องเป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่า สามารถผลิตกรดซัคซินิคได้ 127.58 กรัมต่อลิตร ผลผลิตต่อน้ำตาลที่ใช้ไปเท่ากับ 0.54 กรัมต่อกรัม มีอัตราการผลิตเท่ากับ 1.77 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และมีประสิทธิภาพการผลิตเท่ากับร้อยละ 80.80 ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสามารถผลิตกรดซัคซินิคจากกากมันสำปะหลังซึ่งเป็นของเหลือทิ้งและยังเป็นการนำก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ซึ่งเป็นก๊าซเรือนกระจกมาใช้ให้เกิดประโยชน์ ซึ่งเป็นวิธีที่มีศักยภาพและมีข้อดีอย่างเห็นได้ชัด

54910150: MAJOR: ENVIRONMENTAL SCIENCE; M.Sc. (ENVIRONMENTAL SCIENCE)

KEYWORDS: SUCCINIC ACID/ CASSAVA PULP

NATTAPONG DITKUNCHAIMONGKOL: SUCCINIC ACID PRODUCTION FROM CASSAVA PULP. ADVISORY COMMITTEE: SEATHAWAT CHAMSART, Ph.D. 154 P. 2016.

Succinic acid is widly used as a precursor for synthesis of other chemicals, food and medical additives. Succinic is mainly produced by chemical process from petroleum-based material. This production is expensive and causes serious pollution problems. Fermentative production of succinic acid from renewable agricultural materials has considerable interest. This research was to study the production of succinic acid from bacteria isolated from buffalo rumen. The production of succinic acid using baffled flask gave a succinic acid concentration of 2.89 g/L. with succinic yield of 0.14 g/g. and productivity of 0.12 g/L/h. with in 24 h. The addition of CO_2 for the production of succinic acid gave a succinic acid concentration of 2.89 g/L. with succinic yield and productivity of 0.14 g/g. and 0.12 g/L/h., respectively. The production of succinic acid in a 5-L batch fermenter with better efficiently controled of conditions, agitation speed and continuous CO_2 sparging gave a succinic yield of 0.58 g/g. with productivity of 2.29 g/L/h., In which they increased 1.29 and 8.14 folds, respectively when compared with the shake flask cultivation. The production of succinic acid from cassava pulp hydrolysate by enzyme in a 5-L fermenter with multiple sequential batch cultivation technical gave a succinic acid concentration of 127.58 g/L. with yield of 0.54 g/g., productivity of 1.77 g/L/h. and efficiency of 80.80 %. The results show the production of succinic acid from cassava pulp waste renewable biological resource and using CO_2, a greenhouse gas, has distinct advantages and potential.

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย…… ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ……... จ

สารบัญ…….. ช

สารบัญตาราง…… ฌ

สารบัญภาพ……... ฎ

บทที่

1. บทนำ…… 1

ที่มาและความสำคัญ…… 1

วัตถุประสงค์การวิจัย……..……. 2

สมมติฐานการวิจัย……...…… 2

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ……..... 3

ขอบเขตการวิจัย……..…… 3

2. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง……. 4

กรดซัคซินิค..…….. 4

การนำกรดซัคซินิคไปใช้ประโยชน์…… 5

การผลิตกรดซัคซินิค…..…….. 6

แบคทีเรียที่ผลิตกรดซัคซินิค……...……. 13

การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตกรดซัคซินิค……...…….. 15

กากมันสำปะหลัง…….……... 16

องค์ประกอบของกากมันสำปะหลัง…… 17

การย่อยหรือไฮโดรไลซิสกากมันสำปะหลัง……... 24

สารบัญ (ต่อ)

บทที่		หน้า
	งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง…….	31
3.	วิธีดำเนินการวิจัย…….……	37
	วัตถุดิบ……...…….	37
	เครื่องมือและอุปกรณ์…….……	37
	สารเคมี……...……...….	38
	เชื้อจุลินทรีย์……..……..	39
	วีธีการทดลอง…….……...……	39
	การวิเคราะห์ผล……...……...……	48
4.	ผลการวิจัย…….……...	50
	การคัดแยกแบคทีเรียจากกระเพาะกระบือที่สามารถผลิตกรดซัคซินิค……...	50
	การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดซัคซินิคของแบคทีเรีย ที่คัดแยกได้…….	62
	การศึกษาการผลิตกรดซัคซินิคแบบกะในถังหมักขนาด 5 ลิตร…..……....	81
	การศึกษาเทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบหลายกะลำดับต่อเนื่องในถังหมัก ขนาด 5 ลิตร……	89
	การศึกษาการใช้กากมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตกรดซัคซินิค…..	93
5.	อภิปราย และสรุปผล……...……..	106
	อภิปรายผล……..……..…..	106
	สรุปผล……...……..	114
	ข้อเสนอแนะ……...……...……..	114
บรรณานุกรม……		118
ภาคผนวก……		128
	ภาคผนวก ก……	129

สารบัญ (ต่อ)

บทที่ หน้า

ภาคผนวก ข..... 135

ภาคผนวก ค..... 140

ประวัติย่อของผู้วิจัย..... 154

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2-1	คุณสมบัติของกรดซัคซินิค……..	4
2-2	เปรียบเทียบกระบวนการผลิตกรดซัคซินิคทางเคมีและทางชีวภาพ…….	8
2-3	การผลิตกรดซัคซินิคจากแบคทีเรียและแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน…..…….	9
2-4	สมบัติที่สำคัญของอะไมโลส และอะไมโลเพคติน……..….	19
3-1	สภาวะการผลิตกรดซัคซินิคแบบกะ (Batch) ที่ทำการเพาะเลี้ยงในถังหมัก ขนาด 5 ลิตร…….	45
3-2	ชุดการทดลองการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์……...…….….	47
4-1	ผลการคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถเจริญและสามารถเปลี่ยนสีของอาหาร Screening agar จากสีเขียวเป็นสีเหลือง……..……..	51
4-2	ผลการทดสอบการผลิตกรดซัคซินิคในขวดทดลอง ขนาด 50 มิลลิลิตร…..…….	60
4-3	ผลิตภัณฑ์กรดอินทรีย์ที่ได้จากการทดสอบในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร.	63
4-4	การผลิตกรดซัคซินิคแบบกะ (Batch) ด้วยแบคทีเรียหมายเลข 37 ในถังหมัก ขนาด 5 ลิตร……...…….….	89
4-5	การผลิตกรดซัคซินิคด้วยแบคทีเรียหมายเลข 37 ด้วยการเพาะเลี้ยงแบบหลาย กะลำดับต่อเนื่อง…….….	93
4-6	ต้นทุนในกระบวนการย่อยกากมันสำปะหลัง……..…….…...	97
4-7	การผลิตกรดซัคซินิคจากน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วย แบคทีเรียหมายเลข 37 โดยการเพาะเลี้ยงแบบหลายกะลำดับต่อเนื่อง …….....	105
5-1	เปรียบเทียบการผลิตกรดซัคซินิคจากแหล่งทรัพยากรหมุนเวียนที่ทดแทนได้.....	113
5-2	การผลิตกรดซัคซินิคจากแบคทีเรียหมายเลข 37 ด้วยสภาวะที่แตกต่างกัน...…...	116
ค-1	ผลวิเคราะห์การเปรียบเทียบ ความเข้มข้นของกรดซัคซินิคในการศึกษาอัตรา การเจริญของของแบคทีเรียหมายเลข 37……...……...	141

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
ค-2	ผลวิเคราะห์ความแปรปรวน ความเข้มข้นของกรดซัคซินิคในการศึกษาแหล่งคาร์บอเนตในสูตรอาหารสำหรับการผลิตกรดซัคซินิค……..…….…….	141
ค-3	ผลวิเคราะห์การเปรียบเทียบ ความเข้มข้นของกรดซัคซินิคในกระบวนการหมักเพื่อผลิตกรดซัคซินิคของถังหมัก 2……...……...	142
ค-4	ผลวิเคราะห์การเปรียบเทียบ ความเข้มข้นของกรดซัคซินิคในกระบวนการหมักเพื่อผลิตกรดซัคซินิคของถังหมัก 3……...……...…	143
ค-5	ผลวิเคราะห์การเปรียบเทียบ ความเข้มข้นของกรดซัคซินิคในกระบวนการหมักเพื่อผลิตกรดซัคซินิคของถังหมัก 4……...…….…..	143
ค-6	ผลวิเคราะห์การเปรียบเทียบการผลิตกรดซัคซินิคแบบกะ (Batch) ด้วยแบคทีเรียหมายเลข 37 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร…….....	144
ค-7	ผลวิเคราะห์การเปรียบเทียบการผลิตกรดซัคซินิแบบหลายกะลำดับต่อเนื่อง (Multiple sequential batch) ด้วยแบคทีเรียหมายเลข 37 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร……..…….……	146
ค-8	ผลวิเคราะห์การเปรียบเทียบการศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์เซลลูเลส……...…...	148
ค-9	ผลวิเคราะห์การเปรียบเทียบการศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์กลูโคอะไมเลส……	150
ค-10	ผลวิเคราะห์การเปรียบเทียบการผลิตกรดซัคซินิคจากน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยแบคทีเรียหมายเลข 37 โดยการเพาะเลี้ยงแบบหลายกะลำดับต่อเนื่อง……...…	152

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2-1	โครงสร้างกรดซัคซินิค……...	4
2-2	การนำกรดซัคซินิคไปใช้ประโยชน์……...…	6
2-3	ปฏิกิริยาการเติมไฮโดรเจน (Hydrogenation) ของ มาเลอิกแอนไฮไดรด์ (Maleic anhydride)……. ……...……...	7
2-4	Pathway ของกระบวนการผลิตกรดซัคซินิคด้วยกระบวนการหมักโดยใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน โดย *A. succinogenes* และ *A. succiniciproducens* …..	15
2-5	กระบวนการผลิตแป้งมันสำปะหลัง……..…	18
2-6	โครงสร้างของอะไมโลส……...…..……..	19
2-7	โครงสร้างของอะไมโลเพกติน……...……	20
2-8	โครงสร้างของเซลลูโลส……...……...…….....	22
2-9	เส้นใยเซลลูโลสในผนังเซลล์พืชชั้นสูง…….……...…..…	23
2-10	การทำงานและผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการทำงานของเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ …….....	28
2-11	โครงสร้างของเซลลูโลส และตำแหน่งที่เอนไซม์ต่าง ๆ เข้าไปย่อยสลาย……..…	30
4-1	กระเพาะอาหารส่วนรูเมนของกระบือที่เก็บตัวอย่าง……..…	50
4-2	ขวดบรรจุตัวอย่างจากกระเพาะของกระบือ……...……...……...	51
4-3	จานเพาะเชื้อที่มีแบคทีเรียเจริญอยู่บนอาหาร Screening agar……	54
4-4	โคโลนีแบคทีเรียที่สามารถเจริญและเปลี่ยนสีอาหาร Screening agar เป็นสีเหลืองได้……...……...……...……..	54
4-5	โคโลนีแบคทีเรียของขวดเก็บตัวอย่างที่ 1 อัตราการเจือจาง 10^{-3}, 10^{-4} และ 10^{-5} ที่คัดเลือก……...……..…	55
4-6	โคโลนีแบคทีเรียของขวดเก็บตัวอย่างที่ 2 อัตราการเจือจาง 10^{-3}, 10^{-4} และ 10^{-5} ที่คัดเลือก……...……..…	56

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
4-7	โคโลนีแบคทีเรียของขวดเก็บตัวอย่างที่ 3 อัตราการเจือจาง 10^{-3}, 10^{-4} และ 10^{-5} ที่คัดเลือก……...……..…	57
4-8	โคโลนีแบคทีเรียของขวดเก็บตัวอย่างที่ 4 อัตราการเจือจาง 10^{-3}, 10^{-4} และ 10^{-5} ที่คัดเลือก……...……..…	58
4-9	โคโลนีแบคทีเรียของขวดเก็บตัวอย่างที่ 5 อัตราการเจือจาง 10^{-3}, 10^{-4} และ 10^{-5} ที่คัดเลือก……...……..……..	59
4-10	น้ำหนักเซลล์แห้งและค่าความขุ่น ของการผลิตกรดซัคซินิคในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร ด้วยแบคทีเรียหมายเลข 37……..…….....	64
4-11	ปริมาณการใช้น้ำตาลกลูโคสในการหมักเพื่อผลิตกรดซัคซินิคในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร ด้วยแบคทีเรียหมายเลข 37……..……..…..	64
4-12	ผลิตภัณฑ์กรดอินทรีย์จากผลิตกรดซัคซินิคในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร ด้วยแบคทีเรียหมายเลข 37……..……..……..	65
4-13	ผลิตภัณฑ์กรดอินทรีย์จากกระบวนการหมักด้วยแบคทีเรียหมายเลข 37 ที่ใช้แหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน……..……...……..	66
4-14	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) และค่าความขุ่นในกระบวนการหมักด้วยแบคทีเรียหมายเลข 37……...…….	67
4-15	ปริมาณการใช้น้ำตาลกลูโคสในการหมักด้วยแบคทีเรียหมายเลข 37……..…	67
4-16	ผลิตภัณฑ์กรดอินทรีย์จากกระบวนการหมักด้วยแบคทีเรียหมายเลข 37……...…	68
4-17	น้ำหนักเซลล์แห้งและค่าความขุ่นในกระบวนการหมักด้วยเชื้อมาตรฐาน…….....	69
4-18	ปริมาณการใช้น้ำตาลกลูโคสในการหมักด้วยเชื้อมาตรฐาน……...	69
4-19	ผลิตภัณฑ์กรดอินทรีย์จากกระบวนการหมักด้วยเชื้อมาตรฐาน……..	70
4-20	เปรียบเทียบกรดซัคซินิคที่ได้จากกระบวนการหมักด้วยเชื้อ 37 กับเชื้อมาตรฐาน.	71

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
4-21	(ก) น้ำหนักเซลล์แห้ง (ข) ปริมาณการใช้น้ำตาล และ (ค) ผลิตภัณฑ์กรดอินทรีย์ที่ได้จากกระบวนการหมักเพื่อผลิตกรดซัคซินิคด้วยน้ำตาลกลูโคสเกรดสำหรับงานวิจัย……...	72
4-22	(ก) น้ำหนักเซลล์แห้ง (ข) ปริมาณการใช้น้ำตาล และ (ค) ผลิตภัณฑ์กรดอินทรีย์ที่ได้จากกระบวนการหมักเพื่อผลิตกรดซัคซินิคด้วยกลีเซอรอล…….....	74
4-23	(ก) น้ำหนักเซลล์แห้ง (ข) ปริมาณการใช้น้ำตาล และ (ค) ผลิตภัณฑ์กรดอินทรีย์ที่ได้จากการผลิตกรดซัคซินิคด้วยน้ำตาลที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง….....	75
4-24	(ก) น้ำหนักเซลล์แห้ง (ข) ปริมาณการใช้น้ำตาล และ (ค) ผลิตภัณฑ์กรดอินทรีย์ที่ได้จากการผลิตกรดซัคซินิคโดยใช้แมกนีเซียมคาร์บอเนต…….……	77
4-25	(ก) น้ำหนักเซลล์แห้ง (ข) ปริมาณการใช้น้ำตาล และ (ค) ผลิตภัณฑ์กรดอินทรีย์ที่ได้จากการผลิตกรดซัคซินิคโดยใช้แมกนีเซียมไดไฮโดรเจนคาร์บอเนต…..….	78
4-26	(ก) น้ำหนักเซลล์แห้ง (ข) ปริมาณการใช้น้ำตาล และ (ค) ผลิตภัณฑ์กรดอินทรีย์ที่ได้จากการผลิตกรดซัคซินิคโดยใช้โซเดียมคาร์บอเนต..…….....	79
4-27	(ก) น้ำหนักเซลล์แห้ง (ข) ปริมาณการใช้น้ำตาล และ (ค) ผลิตภัณฑ์กรดอินทรีย์ที่ได้จากการผลิตกรดซัคซินิคโดยใช้โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต……..……	80
4-28	(ก) น้ำหนักเซลล์แห้ง (ข) ปริมาณการใช้น้ำตาล และ (ค) ผลิตภัณฑ์กรดอินทรีย์ที่ได้จากการผลิตกรดซัคซินิคของถังหมัก 1……...…	83
4-29	(ก) น้ำหนักเซลล์แห้ง (ข) ปริมาณการใช้น้ำตาล และ (ค) ผลิตภัณฑ์กรดอินทรีย์ที่ได้จากการผลิตกรดซัคซินิคของถังหมัก 2……..……..……	84
4-30	(ก) น้ำหนักเซลล์แห้ง (ข) ปริมาณการใช้น้ำตาล และ (ค) ผลิตภัณฑ์กรดอินทรีย์ที่ได้จากการผลิตกรดซัคซินิคของถังหมัก 3……..……	86
4-31	(ก) น้ำหนักเซลล์แห้ง (ข) ปริมาณการใช้น้ำตาล และ (ค) ผลิตภัณฑ์กรดอินทรีย์ที่ได้จากการผลิตกรดซัคซินิคของถังหมัก 4……..……	88

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
4-32	น้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้จากการผลิตกรดซัคซินิคของการเพาะเลี้ยงแบบหลายกะลำดับต่อเนื่อง……...…….....	91
4-33	ปริมาณการใช้น้ำตาลที่ได้จากการผลิตกรดซัคซินิคของการเพาะเลี้ยงแบบหลายกะลำดับต่อเนื่อง……...……...……	91
4-34	ผลิตภัณฑ์กรดอินทรีย์ที่ได้จากการผลิตกรดซัคซินิคของการเพาะเลี้ยงแบบหลายกะลำดับต่อเนื่อง……...……...……...……	92
4-35	ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดซัลฟิวริกที่ความเข้มข้นแตกต่างกันในสภาวะอุณหภูมิแตกต่างกัน…….....…….....	94
4-36	ปริมาณกากคงเหลือจากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดซัลฟิวริก…….....	95
4-37	ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์ที่แตกต่างกัน……...……...	96
4-38	ปริมาณกากคงเหลือจากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์…….....	96
4-39	ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์เซลลูเลส...	98
4-40	แป้งที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์เซลลูเลส……...…...…	99
4-41	ปริมาณกากคงเหลือที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์เซลลูเลส…..	99
4-42	ปริมาณน้ำตาลกลูโคส ปริมาณแป้ง และกากคงเหลือที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์เซลลูเลส……...……....……	100
4-43	ปริมาณน้ำตาลกลูโคสจากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์กลูโคอะไมเลส	101
4-44	ค่า DE (%) จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์กลูโคอะไมเลส…….……	101
4-45	น้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้จากการผลิตกรดซัคซินิคจากกากมันสำปะหลัง……..…	103
4-46	ปริมาณการใช้น้ำตาลที่ได้จากการผลิตกรดซัคซินิคจากกากมันสำปะหลัง..….....	104
4-47	ผลิตภัณฑ์กรดอินทรีย์ที่ได้จากการผลิตกรดซัคซินิคจากกากมันสำปะหลัง…...…	105
ข-1	กราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นแป้ง…	139

บทที่ 1
บทนำ

ที่มาและความสำคัญ

กรดซัคซินิค (Succinic acid) มีสูตรโมเลกุลคือ $C_4H_6O_4$ พบครั้งแรกในอำพัน (Amber) กรดซัคซินิคเป็นสารตัวกลางและผลิตภัณฑ์ที่สำคัญและมีบทบาทในการนำไปใช้อย่างกว้างขวาง สำหรับอุตสาหกรรมต่าง ๆ เช่น อุตสาหกรรมการผลิตอาหาร สารปรุงแต่งอาหาร อุตสาหกรรมยา สารลดแรงตึงผิว ผงซักฟอก สารฆ่าเชื้อโรค สารตัวกลางในการทำน้ำหอม กรดซัคซินิคยังเป็นสารตัวกลางสำหรับอุตสาหกรรมเคมี ถูกนำไปใช้ในการสังเคราะห์สารเคมีหลากหลายชนิด เช่น 1,4-Butanediol, Tetrahydrofuran, Adipic acid, n-Methylpyrrolidinone (NMD) และ Linear aliphatic esters เป็นต้น นอกจากนี้กรดซัคซินิคยังสามารถนำไปใช้ในการผลิตเม็ดพลาสติกสังเคราะห์ที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (Biodegradable plastics) (Song & Lee, 2006)

กระบวนการผลิตกรดซัคซินิค ในปัจจุบันอาศัยกระบวนการทางเคมีโดยอาศัยปฏิกิริยาการเติมไฮโดรเจน (Hydrogenation) ของ มาเลอิกแอนไฮไดรด์ (Maleic anhydride) ที่ได้จากปิโตรเลียม กระบวนการผลิตดังกล่าวต้องใช้โลหะหนักเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาภายใต้สภาวะที่มีอุณหภูมิและความดันสูง กระบวนการผลิตมีราคาสูงทำให้กรดซัคซินิคที่ได้มีราคาสูงตามไปด้วย และยังก่อให้เกิดผลกระทบทางลบต่อสิ่งแวดล้อม (Liu et al., 2008) ในขณะที่กรดซัคซินิคนั้นสามารถผลิตได้ด้วยกระบวนการทางชีวภาพ โดยอาศัยกระบวนการหมักของแบคทีเรียแบบที่ไม่ใช้ออกซิเจน (Anaerobic cultivation) โดยการใช้วัตถุดิบที่สามารถทดแทนได้หรือทรัพยากรหมุนเวียน (Renewable resources) วัตถุดิบและเศษวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเป็นวัตถุดิบหลักในกระบวนการหมัก ทำให้กรดซัคซินิคที่ได้มีราคาที่ต่ำกว่าการผลิตจากปิโตรเลียมและยังเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมด้วย (Zheng, Dong, Sun, Ni, & Fang, 2009)

กระบวนการผลิตกรดซัคซินิคทางชีวภาพนั้นอาศัยกระบวนการหมักแบบไม่ใช้ออกซิเจนของแบคทีเรีย ซึ่งแบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดซัคซินิคได้มีอยู่หลายชนิด เช่น *Anaerobiospirillum succiniciproducens*, *Mannheimia succiniciproducens* และ *Actinobacillus succinogenes* (Beauprez, Mey, & Soetaert, 2010) ในกระบวนการหมักเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์กรดซัคซินิคที่ผลผลิตสูงและมีประสิทธิภาพสูงสุดด้วยนั้นต้องอาศัยปัจจัยต่าง ๆ เช่น สูตรอาหารสำหรับเลี้ยงแบคทีเรียที่เหมาะสม ชนิดของแบคทีเรีย ความเป็นกรดด่าง ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ แหล่งไนโตรเจน และปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญมากคือ แหล่งคาร์บอนที่ใช้เป็นแหล่งอาหารและ

พลังงานที่สำคัญในการเจริญของแบคทีเรีย ซึ่งนอกจากจะส่งผลต่อการผลิตกรดซัคซินิคที่มีประสิทธิภาพแล้วยังเป็นปัจจัยที่ส่งผลต่อต้นทุนในกระบวนการผลิตด้วย

ด้วยเหตุดังกล่าวจึงมีงานวิจัยต่าง ๆ จำนวนมากที่หาแหล่งคาร์บอนที่มีประสิทธิภาพและมีราคาถูกเพื่อนำมาใช้ในกระบวนการผลิตกรดซัคซินิค แหล่งคาร์บอนที่สำคัญที่มีการนำมาใช้อย่างกว้างขวางนั้นมาจากทรัพยากรธรรมชาติที่สามารถทดแทนได้ ชีวมวล วัตถุดิบทางการเกษตร เช่น มันสำปะหลัง ข้าวโพด อ้อย เป็นต้น และยังได้มาจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร เช่น ซังข้าวโพด ฟางข้าว เมล็ดข้าวสาลี เป็นต้น ประกอบกับประเทศไทยเป็นเมืองเกษตรกรรม มีการผลิตสินค้าทางการเกษตรหลากหลายชนิดและเป็นปริมาณมาก ทำให้เกิดวัสดุเหลือทิ้งและของเสียที่ไม่ต้องการเป็นปริมาณมากเช่นกัน พืชผลทางการเกษตรที่สำคัญของประเทศไทยคือ มันสำปะหลัง ซึ่งมีการเพาะปลูกในหลายภูมิภาคของประเทศ คิดเป็นการเพาะปลูกและส่งออกแป้งมันสำปะหลังเป็นอันดับต้น ๆ ของโลก ซึ่งในกระบวนการผลิตแป้งมันสำปะหลังนั้นทำให้มีวัสดุเหลือทิ้งและของเสียที่ไม่ต้องการเป็นปริมาณมาก นั่นคือ กากมันสำปะหลัง จากกระบวนการผลิตแป้งมันสำปะหลัง จึงเป็นที่น่าสนใจที่จะนำกากมันสำปะหลังมาใช้ในการผลิตกรดซัคซินิคซึ่งเป็นของที่มีมูลค่า โดยการนำกากมันสำปะหลังที่ผ่านกระบวนการย่อยด้วยเอนไซม์มาใช้เป็นแหล่งอาหารให้แบคทีเรียในกระบวนการผลิตกรดซัคซินิค ซึ่งนอกจากจะเป็นวัตถุดิบที่มีราคาถูกแล้วยังเป็นการจัดการของเสียหรือวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรให้มีประสิทธิภาพสูงสุดและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม

วัตถุประสงค์การวิจัย

1. เพื่อคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดซัคซินิคได้จากกระเพาะกระบือ
2. เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดซัคซินิคของแบคทีเรียที่คัดแยกได้
3. เพื่อศึกษาการผลิตกรดซัคซินิคในถังหมักขนาด 5 ลิตร
4. เพื่อศึกษาการใช้กากมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตกรดซัคซินิค

สมมติฐานการวิจัย

1. สามารถคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดซัคซินิคได้จากกระเพาะกระบือ
2. สามารถหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดซัคซินิคโดยกระบวนการหมัก
3. การควบคุมสภาวะการผลิตที่ดีในถังหมักขนาด 5 ลิตร ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพและผลผลิตของกรดซัคซินิค
4. สามารถใช้กากมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับกระบวนการผลิตกรดซัคซินิคได้

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถนำกากมันสำปะหลังซึ่งเป็นวัสดุเหลือทิ้งและของเสียจากกระบวนการผลิตแป้งมันสำปะหลังมาใช้ในการผลิตกรดซัคซินิค

2. สามารถใช้แหล่งทรัพยากรธรรมชาติที่สามารถทดแทนได้หรือทรัพยากรหมุนเวียนของเสียจากกระบวนการผลิตมาใช้ในกระบวนหมักเพื่อผลิตกรดซัคซินิค ซึ่งจะส่งผลดีต่อสิ่งแวดล้อม

3. สามารถขยายขนาดการผลิตเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพและผลผลิตของกรดซัคซินิค ซึ่งจะใช้เป็นแนวทางการผลิตในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

ขอบเขตการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้เป็นการศึกษากระบวนการหมักเพื่อผลิตกรดซัคซินิคโดยใช้แบคทีเรียที่คัดแยกได้จากกระเพาะกระบือ โดยศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมที่สามารถผลิตกรดซัคซินิคได้ดีที่สุดในการทดลองในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงแบบเขย่าและในถังหมักขนาด 5 ลิตร และศึกษาการนำกากมันสำปะหลังมาผ่านกระบวนการย่อยให้เป็นน้ำตาลเพื่อใช้เป็นแหล่งอาหารสำหรับแบคทีเรียในกระบวนการหมักเพื่อผลิตกรดซัคซินิคในถังหมักขนาด 5 ลิตร

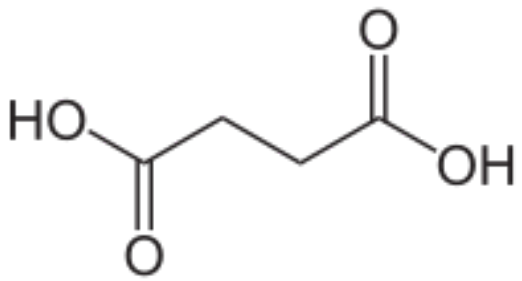
บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

กรดซัคซินิค (Succinic acid)

กรดซัคซินิค (Succinic acid) มีชื่อทางระบบ IUPAC คือ Butanedioic acid มีสูตรโครงสร้างคือ $C_4H_6O_4$ ถูกค้นพบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1546 โดย Georgius Agricola ซึ่งพบว่ากรดซัคซินิคเป็นองค์ประกอบหนึ่งของอำพันสีเหลือง (Amper) (Song & Lee, 2006) กรดซัคซินิคบริสุทธิ์มีลักษณะเป็นผลึกของแข็ง มีสีขาวขุ่น ไม่มีกลิ่น ละลายน้ำได้เพียงเล็กน้อย สามารถละลายได้ดีในเอทานอล มีจุดหลอมเหลวประมาณ 185–187 องศาเซลเซียส และมีจุดเดือดประมาณ 235 องศาเซลเซียส (ตารางที่ 2-1)

ตารางที่ 2-1 คุณสมบัติของกรดซัคซินิค (Sauer, Porro, Mattanovich, & Branduardi, 2008)

กรดซัคซินิค	
สูตรโครงสร้าง	$C_4H_6O_4$
น้ำหนักโมเลกุล	118.09 g/mol
จุดหลอมเหลว	189 ^{o}C
จุดเดือด	235 ^{o}C
ความถ่วงจำเพาะ	1.57



ภาพที่ 2-1 โครงสร้างกรดซัคซินิค (Beauprez et al., 2010)

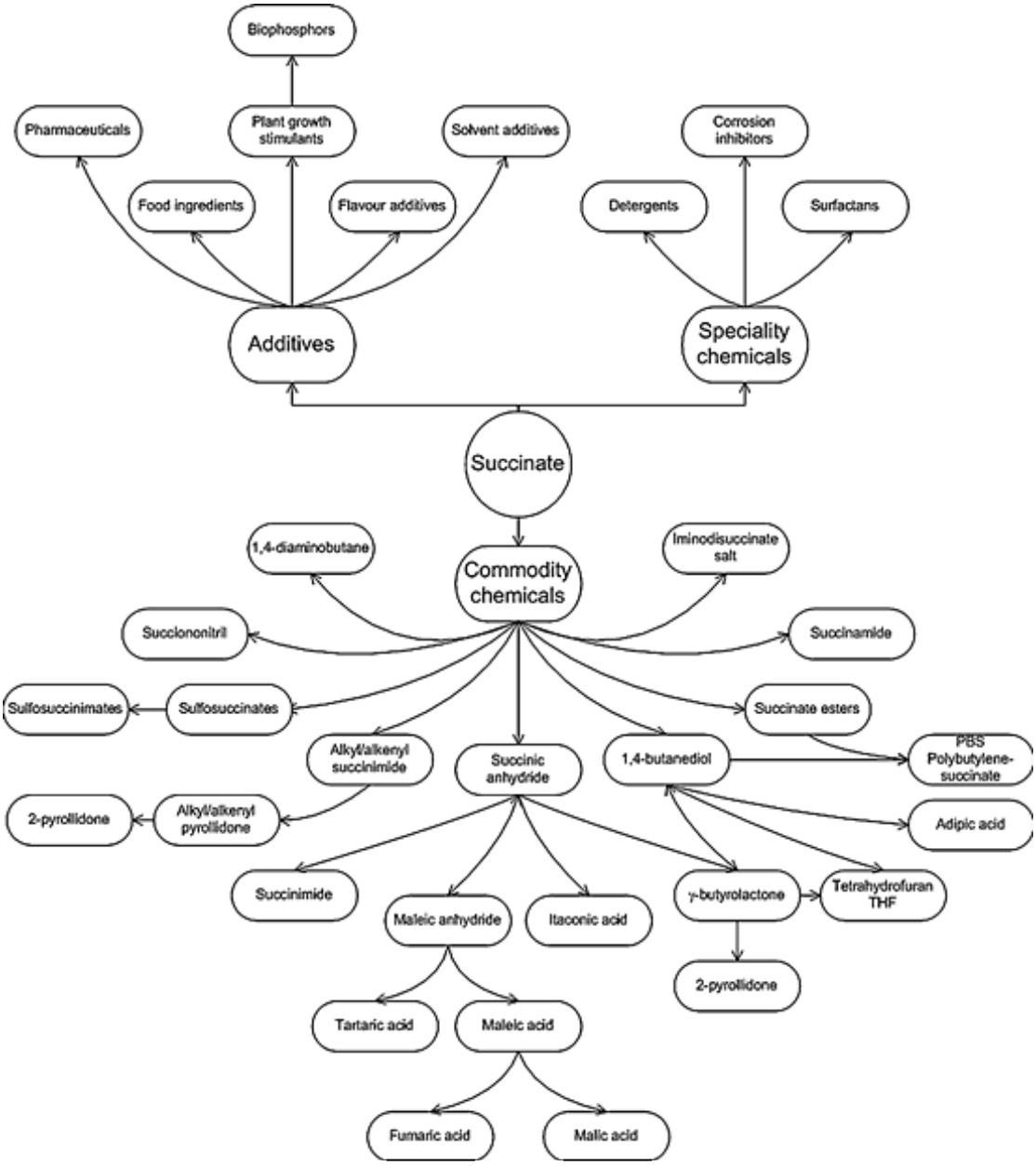
กรดซัคซินิคสามารถพบได้ในทั่วไปในรูปของสารตัวกลาง (Intermediate) ในกระบวนการเมแทบอลิซึมของพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ ซึ่งมีบทบาทสำคัญเป็นสารตัวกลางในวัฏจักรกรดซิตริก (Citric acid cycle) หรือวัฏจักรเครบส์ (Kreb's cycle) หรือวัฏจักรกรดไตรคาร์บอกซิลิก (Tricarboxylic acid cycle; TCA cycle) (Huh, Jun, Hong, Lee, & Hong, 2006) ทำให้กรดซัคซินิคถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวางในการเป็นสารตัวกลาง และสารตั้งต้นสำหรับกระบวนการสังเคราะห์สารเคมีหลาย ๆ ชนิด จึงถูกนำไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอย่างกว้างขวาง เช่น อุตสาหกรรมอาหาร ยารักษาโรค การผลิตสารเคมี เป็นต้น

การนำกรดซัคซินิคไปใช้ประโยชน์

กรดซัคซินิคมีบทบาทสำคัญอย่างมากและถูกนำไปใช้อย่างกว้างขวางในกระบวนการผลิตผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ที่ใช้ในอุตสาหกรรม โดยสามารถนำไปใช้ในการเป็นสารตั้งต้น (Precursor) ในการสังเคราะห์สารเคมีหลาย ๆ ชนิด เช่น 1,4-butanediol (BDO) ซึ่งถูกนำมาใช้ในการผลิตพลาสติกชีวภาพที่สามารถย่อยสลายได้ (Biodegradable plastics) (Jame, McKinlay, Vieille, & Zeikus, 2007) *N*-methyl pyrrolidinone ซึ่งใช้เป็นสารละลายในอุตสาหกรรมแทนการใช้ Methylene chloride ที่มีความเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม Gamma-butyrolactone ซึ่งใช้เป็นสารตัวกลางในกระบวนการกำจัดสีของอุตสาหกรรมทอผ้า (Jame et al., 2007) Adipic acid ซึ่งใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตไนลอน อีกทั้งยังใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตกาวประสาน และในผลิตภัณฑ์อาหารอีกด้วย Tetrahydrofuran (THF) ซึ่งนำมาใช้ในการผลิตพลาสติกที่ทนความร้อน และใช้เป็นสารละลายที่สำคัญในการบวนการผลิต (Jame et al., 2007)

นอกจากนำมาใช้ในการสังเคราะห์สารเคมีแล้วกรดซัคซินิคยังมีบทบาทในการเป็นสารเคมีตัวกลางในกระบวนการผลิตยารักษาโรค ในอุตสาหกรรมอาหารมีการใช้โซเดียมซัคซิเนท (Sodium succinate) เป็นสารปรุงแต่งรสในอาหารแทนการใช้โมโนโซเดียมกลูตาเมต (Monosodium glutamate) ในอาหารสัตว์ เช่น อาหารสุกรมีการเติมเกลือซัคซิเนทเข้าไปเป็นส่วนผสม เป็นต้น (Zeikus, Jain, & Elankovan, 1999)

กรดซัคซินิคยังเป็นสารตัวกลางสำหรับการผลิตสารเคมีและวัสดุสีเขียว (Green chemicals and materials) ตัวอย่าง เช่น Diethyl succinate ซึ่งถูกนำมาใช้เป็นสารละลายสำหรับทำความสะอาดพื้นผิวของโลหะ หรือใช้เป็นน้ำยาขัดสี (Paint stripping) และ Ethylene – diaminedisuccinate ถูกนำมาใช้เป็น Chelator แทน Ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) (Zeikus et al., 1999)



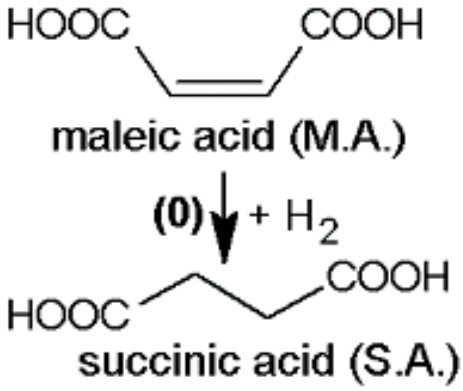
ภาพที่ 2-2 การนำกรดซัคซินิคไปใช้ประโยชน์ (Beauprez et al., 2010)

การผลิตกรดซัคซินิค

1. การผลิตกรดซัคซินิคทางเคมี

กระบวนการผลิตกรดซัคซินิคแต่ดั้งเดิมนั้นเป็นการสังเคราะห์ทางเคมี โดยมีวัตถุดิบหลัก คือ มาเลอิกแอนไฮไดรด์ (Maleic anhydride) ซึ่งได้มาจากบิวเทน (N-Butane) หรือมาจากเบนซีน (Benzene) โดยอาศัยกระบวนการสังเคราะห์จากปิโตรเลียม (Aghaziarati, Soltanieh, Kazemeini, &

Khandan, 2008) ขั้นตอนการผลิตเกิดขึ้นโดยการนำมาเลอิกแอนไฮไดรด์มาทำปฏิกิริยาการเติมไฮโดรเจน (Hydrogenation) โดยใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาจำพวก Pd-Sn/SiO_2 , Pd/SiO_2 และ Pd-Mo-Ni/SiO_2 ภายใต้อุณหภูมิที่สูงถึง 220 – 260 องศาเซลเซียส และที่ความดัน 5 – 8 เมกะปาสคาล (MPa) (Feng, Yin, Wang, Xie, & Jiang, 2012)



ภาพที่ 2-3 ปฏิกิริยาการเติมไฮโดรเจนของมาเลอิกแอนไฮไดรด์ (Delhomme, Botz, & Kuhn, 2009)

จะเห็นได้ว่าในปัจจุบันกระบวนการผลิต กรดซัคซินิคส่วนมากมาจากกระบวนสังเคราะห์ทางเคมี โดยอาศัยกระบวนการเติมไฮโดรเจนของ Maleic anhydride ที่มาจาก N-butane ซึ่งมีที่มาจากแหล่งน้ำมันปิโตรเลียมทั้งสิ้น การสังเคราะห์ทางเคมีจากปิโตรเลียมซึ่งเป็นทรัพยากรที่ใช้แล้วหมดไป มีราคาสูง และในกระบวนการผลิตยังปล่อยมลพิษออกสู่สิ่งแวดล้อมอีกด้วย (Liu et al., 2008)

2. การผลิตกรดซัคซินิคโดยอาศัยกระบวนการหมัก

การผลิตกรดซัคซินิคด้วยกระบวนการทางชีวภาพกำลังเป็นที่น่าสนใจแทนที่การผลิตแบบดั้งเดิมจากปิโตรเลียมโดยอาศัยกระบวนการหมักจากทรัพยากรที่สามารถทดแทนได้ ซึ่งจะเป็นการใส่ใจต่อสิ่งแวดล้อมและเป็นกระบวนการผลิตที่มีราคาถูกกว่า (Corona-Gonza´ lez, Bories, Gonza´ lez-A´ lvarez , & Pelayo-Ortiz, 2008)

ตารางที่ 2-2 เปรียบเทียบกระบวนการผลิตกรดซัคซินิคทางเคมีและทางชีวภาพ (Cukalovic & Stevens, 2008)

	Production method	
	Petrochemical	**Bio-chemical**
Origin	Non-renewable feedstocks	Renewable feedstocks-carbohydrates
Price Considerations	Still cheaper than Renewable resources	Downstream processing much More expensive than feedstocks
Routes	Developed routes ; Established technology	Routes under constant Improvement; young technology
Yields and productivity	Generally high	Significant amounts of by-products are common; diluted madia; long reaction times
Major disadvantages	High energy demands (pressure and temperature); Catalyst disposal problems	Sensitive microorganisms; Complex additional nutrients often needed; complicated product recovery; large amounts of waste
Public awareness	Decreasing popularity	Increased interest

กระบวนการหมักหรือผลิตกรดซัคซินิคนั้นอาศัยการทำงานของจุลินทรีย์ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดซัคซินิค ซึ่งมีการศึกษากันอย่างกว้างขวางดังเช่นตารางที่ 2 - 3 เนื่องจากกระบวนการหมักเป็นการใช้ทรัพยากรธรรมชาติที่สามารถทดแทนได้ หรือมีการใช้ชีวมวล หรือวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร เช่น มันสำปะหลัง ข้าวโพด ฟางข้าว เป็นต้น ซึ่งวัตถุดิบที่ใช้ในกระบวนการหมักเหล่านี้ล้วนแต่มีราคาถูก เป็นทรัพยากรที่สามารถทดแทนได้ เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม และยังจะก่อให้เกิดการพัฒนาที่ยั่งยืน (Wu, Li, Zhou, Xie, & Ye, 2009)

ตารางที่ 2-3 การผลิตกรดซัคซินิคจากแบคทีเรียและแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน

Strain	Substrates	Methods	Succinic acid (g /l)	Succinic acid yield (%)	Productivity (g/l/h)	Reference
Actinobacillus. succinogenes						
130Z	Whey	Anaerobic, batch	21.50	0.44	0.57	Wan et al. (2008)
130Z	Glucose	Anaerobic, batch	67.20	0.80	0.70	Guettier et al. (1998)
CGMCC 2650	Corn straw	Anaerobic, batch	15.80	0.62	1.23	Li et al. (2010)
CGMCC 1593	Cane molasses	Anaerobic, batch	50.60	0.84	0.80	Liu et al. (2008)
CIP 106512	Sugarcane bagasse	Anaerobic, batch	22.50	1.01	0.43	Elcio and Nei. (2011)
Actinobacillus. succiniciproducens						
ATCC53488	Glucose	Anaerobic, batch	34.40	1.80	0.86	Lee et al. (1999)
ATCC29305	Whey	Anaerobic, continuous	19.80	3.00	0.64	Samuelov et al. (1999)
ATCC29305	Glucose	Anaerobic, continuous	14.30	3.30	0.71	Lee et al. (2008)
Mannheimia. succiniciproducens						
MBEL55E	Glucose	Anaerobic, batch	14.00	1.87	0.70	Lee et al. (2002)
MBEL55E	Glucose	Anaerobic, batch	10.50	1.75	0.59	Song et al. (2007)
LPK7	Glucose	Anaerobic, fed-batch	52.40	1.75	0.76	Lee et al. (2006)

ตารางที่ 2-3 (ต่อ)

Strain	Substrates	Methods	Succinic acid (g /l)	Succinic acid yield (%)	Productivity (g/l/h)	Reference
Escherichia. coli						
NZN111	Glucose	Anaerobic, batch	12.80	0.29	0.64	Stols and Donnelly. (1997)
AFP111	Glucose	Dual phase aeration, batch	51.00	0.52	0.54	Gokarn et al. (1998)
AFP184	Glucose	Dual phase aeration, batch	38.00	1.27	0.80	Vemuri et al. (2002)
KJ060	Glucose	Anaerobic, batch	86.50	0.90	0.93	Jantama et al. (2008)
HL27659k-pepc	Glucose	Aerobic, fed-batch	58.30	0.72	0.62	Lin et al. (2005)
W3110	Cane molasses	Dual phase aeration, batch	26.00	0.87	0.52	Agarwal et al. (2007)
Corynebacterium. glutamicum						
R	Glucose	Micro aerobic, fed-batch	23.00	3.83	0.19	Okino et al. (2005)
Bacteroides. fragilis						
MTCC1045	Glucose	Anaerobic, batch	12.50	0.42	0.62	Isar et al. (2006)
MTCC1046	Glucose	Anaerobic, batch	20.00	0.83	0.57	Isar et al. (2007)
Prevotella. ruminocola						
ATCC19188	Glucose	Anaerobic, batch	18.90	0.52	-	Guettier et al. (1998)

ปัจจัยในกระบวนการหมักเพื่อผลิตกรดซัคซินิค

1. แหล่งคาร์บอน

แหล่งคาร์บอนเป็นสิ่งที่มีความจำเป็นสำหรับสิ่งมีชีวิตในการสร้างพลังงาน และนำไปสังเคราะห์ทางชีวภาพ เพื่อสร้างผลิตภัณฑ์ และการบำรุงเซลล์ คาร์โบไฮเดรตเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีขายในทางการค้าและสามารถนำมาใช้ในการเป็นแหล่งพลังงานของจุลินทรีย์ในการหมักได้เป็นอย่างดี และนิยมใช้มาก เช่น กลูโคส ซูโครส แหล่งคาร์บอนถือเป็นปัจจัยหลักที่สำคัญสำหรับกระบวนการหมักเพื่อผลิตกรดซัคซินิค ซึ่งนอกจากจะส่งผลต่อการผลิตผลิตภัณฑ์ที่ได้แล้วยังส่งผลต่อราคาต้นทุนในการผลิตอีกด้วย (Agarwal, Isar, Meghwanshi, & Saxena, 2006) แหล่งคาร์บอนที่นิยมนำมาใช้เป็นจำนวนมาก คือ น้ำตาลกลูโคส (Gallmetzer, Meraner, & Burgstaller, 2002; Urbance, Pometto, Dispirito, & Denli, 2004; Vemuri, Eiteman, & Altman, 2002) นอกจากนี้ยังมีการลดต้นทุนในการผลิตโดยใช้แหล่งคาร์บอนที่มีราคาถูกที่ได้มาจากวัตถุดิบทางการเกษตร ชีวมวล เศษวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรหรือของเสียที่ได้จากการผลิตผลิตภัณฑ์อื่น ๆ เช่น กากน้ำตาล (Liu et al, 2008) เปลือกและซังข้าวโพด (Zheng, Dong, Sun, Ni, & Fang, 2009) กากแคโนล่า หรือกากเรพซีด (Chen, Zhang, Miao, Wei, & Chen, 2011) กากสาเก (Chen, Zhang, Miao, Jiang, & Chen, 2010) ของเสียจากการผลิตข้าวสาลี (Dorado et al, 2009) เป็นต้น

2. ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนเริ่มต้น

นอกจากชนิดของแหล่งคาร์บอนแล้วในกระบวนการหมักเพื่อผลิตกรดซัคซินิคยังต้องคำนึงถึงความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนเริ่มต้นด้วย เนื่องจากการผลิตที่ใช้แหล่งคาร์บอนเริ่มต้นที่เหมาะสมจะทำให้ได้กรดซัคซินิคในปริมาณสูง ในขณะที่ในการผลิตถ้าใช้แหล่งคาร์บอนที่มีความเข้มข้นสูงเกินไป จะทำให้ช่วง Lag phase นั้นยาวนานมากขึ้นส่งผลให้เกิดการยับยั้งการผลิตกรดซัคซินิคของแบคทีเรียหรือแบคทีเรียสามารถผลิตกรดซัคซินิคได้ต่ำลง จากการศึกษาของ Lin และคณะเมื่อทดลองใช้ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนเริ่มต้นตั้งแต่ 2.8 ถึง 143 กรัมต่อลิตร พบว่าทำให้ช่วง Lag phase นั้นเพิ่มขึ้นเท่ากับเวลา 0 ถึง 6.8 ชั่วโมง (Lin, Du, Koutinas, Wang, & Webb, 2008) การศึกษาการใช้เปลือกข้าวโพดที่ผ่านการย่อยเป็นน้ำตาลแล้วเป็นแหล่งคาร์บอนในกระบวนการหมักที่ใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นตั้งแต่ 20 ถึง 100 กรัมต่อลิตร ผลการทดลองพบว่าการใช้แหล่งคาร์บอนเริ่มต้นที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 80 กรัมต่อลิตรขึ้นไป ทำให้การผลิตกรดซัคซินิคนั้นต่ำลง มีปริมาณน้ำตาลคงเหลือมากขึ้น (Zheng et al., 2009) การศึกษาการผลิตกรดซัคซินิคด้วยแบคทีเรีย *A. succinogenes* CGMCC1593 พบว่าเมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นเพิ่มขึ้นจาก 50 กรัมต่อลิตร เป็น 75 กรัมต่อลิตร ทำให้อัตราการเจริญสูงสุดของเชื้อนั้นลดลง และ

อัตราการผลิตกรดซัคซินิคลดลงจาก 1.3 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง เป็น 1.0 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง (Liu et al., 2008)

3. แหล่งไนโตรเจน

ในการผลิตกรดซัคซินิคด้วยกระบวนการหมักนั้นต้องอาศัยแหล่งไนโตรเจนเป็นแหล่งแร่ธาตุที่สำคัญสำหรับการเจริญของแบคทีเรียในการผลิตกรดซัคซินิค จากการศึกษาพบว่ามีการใช้แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดซัคซินิคที่แตกต่างกัน มีรายงานการใช้ยีสต์สกัด (Yeast extract) เป็นแหล่งไนโตรเจนที่สามารถผลิตกรดซัคซินิคได้สูงที่สุดโดยแบคทีเรีย *A. succinogenes* (Liu et al., 2008) เช่นเดียวกับงานวิจัยอื่น ๆ ที่มีการผลิตกรดซัคซินิคโดยใช้ยีสต์สกัดในกระบวนการผลิต (Li et al., 2011) การศึกษาการผลิตกรดซัคซินิคโดย *B. fragilis* ผลการศึกษาพบว่า การใช้ทริปโตน (Tryptone) เป็นแหล่งไนโตรเจนสามารถผลิตกรดซัคซินิคได้สูงที่สุด (Isar, Agarwal, Saran, & Saxena, 2006) เช่นเดียวกับงานวิจัยที่ศึกษาการผลิตกรดซัคซินิคโดย *E. coli* ซึ่งพบว่า สามารถผลิตกรดซัคซินิคได้สูงที่สุดโดยมีแหล่งไนโตรเจนเป็นทริปโตนและน้ำแช่ข้าวโพด (Corn steep liquor) แต่น้ำแช่ข้าวโพดนั้นมีราคาถูกกว่าทริปโตนจึงเป็นทางเลือกที่ดีในการประหยัดต้นทุนในการผลิต (Agarwal et al., 2006) นอกจากนี้ยังมีการใช้แหล่งไนโตรเจนจาก 2 แหล่งรวมกันในกระบวนการหมัก โดยใช้ยีสต์สกัดและน้ำแช่ข้าวโพดเป็นแหล่งไนโตรเจน (Zheng et al., 2009; Jiang et al., 2013)

4. อุณหภูมิ

อุณหภูมิที่เหมาะสมนับเป็นปัจจัยที่สำคัญที่จะส่งผลต่อการเจริญของแบคทีเรียและการผลิตกรดซัคซินิค โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมจะอยู่ในช่วง 37 ± 2 องศาเซลเซียส เนื่องจากแบคทีเรียที่ใช้ในการผลิตกรดซัคซินิคนั้นคัดแยกได้จากกระเพาะวัวส่วนรูเมนซึ่งมีอุณหภูมิประมาณ 39 องศาเซลเซียส (Isar et al., 2006) เช่นเดียวกับรายงานการวิจัยที่พบว่า อุณหภูมิ 37 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดซัคซินิคโดยแบคทีเรีย *B. fragilis* (Macy, Ljungdahl, & Gottschalk, 1978) งานวิจัยการศึกษาการผลิตกรดซัคซินิคด้วยอุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียส พบว่า อุณหภูมินี้มีความเหมาะสมสำหรับการเจริญและการผลิตกรดซัคซินิคโดยแบคทีเรีย *A. succiniciproducens* (Lee, Cheon, Lee, & Chang, 2008) งานวิจัยการใช้อุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียส เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดซัคซินิคโดยแบคทีเรีย *M. succiniciproducens* LPK7 (Oh et al., 2008) ในขณะที่ยังมีอีกหลากหลายงานวิจัยที่ผลิตกรดซัคซินิคโดยแบคทีเรีย *A. succinogenes* โดยมีอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับกระบวนการผลิต (Liu et al, 2008; Chen et al, 2010; Zheng et al, 2009)

5. ค่าความเป็นกรดด่าง (pH)

อีกปัจจัยหนึ่งที่ส่งผลต่อการเจริญและการผลิตกรดซัคซินิคของแบคทีเรียคือ ค่าความเป็นกรดด่าง ซึ่งจะต้องมีค่าอยู่ในช่วงที่เหมาะสมก็จะส่งผลทำให้แบคทีเรียมีการเจริญดีที่สุด จากการศึกษาพบว่า มีรายงานการศึกษาการผลิตกรดซัคซินิคโดยใช้ค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมเท่ากับ 6.5 (Oh et al., 2008; Lee et al., 2008), 6.8 (Chen et al., 2010; Xi et al., 2013) และ 7.0 (Li et al., 2010) จะเห็นได้ว่างานวิจัยส่วนใหญ่พบว่าค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมนั้นอยู่ในช่วง 6.0 – 7.0

แบคทีเรียที่ผลิตกรดซัคซินิค

1. *Actinobacillus succinogenes*

A. succinogenes จัดเป็นแบคทีเรียชนิดหนึ่งที่มีการนำมาใช้ในกระบวนการผลิตกรดซัคซินิคกันอย่างกว้างขวาง เนื่องจากสามารถนำพันธุ์ดั้งเดิมมาผ่านการคัดเลือกเอาเฉพาะสายพันธุ์ที่สามารถผลิตกรดซัคซินิคได้ในปริมาณสูง *A. succinogenes* ดั้งเดิมนั้นสามารถคัดแยกได้จากกระเพาะอาหารส่วนรูเมน (Rumen) ของสัตว์เคี้ยวเอื้องทั้งโคและกระบือ ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ เป็นแบคทีเรียแกรมลบ มีรูปร่างท่อนหรือท่อนกลม ซึ่งดำรงชีวิตอยู่ภายใต้สภาพที่ไม่มีออกซิเจน (Anaerobic) ในการผลิตกรดซัคซินิคของเชื้อนั้นจำเป็นต้องมีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในระดับที่สูงเพื่อช่วยเพิ่มผลิตภัณฑ์ที่ได้ให้เป็นกรดซัคซินิค ในขณะที่ถ้ามีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในระดับที่ต่ำ จะได้ผลิตภัณฑ์เป็นเอทานอล กรดฟอร์มิก หรือกรดอะซิติกแทน **(**Song & Lee, 2006**)**

A. succinogenes สามารถผลิตกรดซัคซินิคโดยสามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้ทั้งน้ำตาลอลาบิโนส (Arabinose) ฟรุกโตส (Fructose) กาแลกโตส (Galactose) กลูโคส (Glucose) แลกโตส (Lactose) มอลโตส (Maltose) ซอบิทอล (Sorbitol) ซูโครส (Sucrose) และน้ำตาลไซโลส (Xylose) เพื่อนำไปใช้ในการผลิตกรดซัคซินิค (Chen et al., 2011) และยังสามารถใช้แหล่งคาร์บอนที่มาจากชีวมวล ของเหลือทิ้งทางการเกษตร เช่น ของเหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตแป้งข้าวโพดและกระบวนการผลิตฝ้าย (Li et al., 2010) กากสาเก (Chen et al., 2010) กากน้ำตาล (Liu et al., 2008) เป็นต้น

2. *Mannheimia succiniciproducens*

จัดเป็นแบคทีเรียอีกชนิดหนึ่งที่มีการนำมาใช้ผลิตกรดซัคซินิค สามารถคัดแยกได้จากกระเพาะอาหารส่วนรูเมนของสัตว์เคี้ยวเอื้องทั้งโคและกระบือ เช่นเดียวกับ *A. succinogenes*

แบคทีเรีย *M. succiniciproducens* ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ซึ่งดำรงชีวิตอยู่ภายใต้สภาพที่ไม่มีออกซิเจนและมีออกซิเจน (Facultative) ชอบอาศัยในอุณหภูมิปานกลาง (Mesophilic) ประมาณ 10 – 40 องศาเซลเซียส สามารถผลิตกรดซัคซินิคได้เป็นผลิตภัณฑ์หลักและมีผลพลอยได้เป็นกรดอะซิติกและกรดฟอร์มิก ในช่วง pH เท่ากับ 6.0 – 7.5 (Song & Lee, 2006)

แบคทีเรีย *M. succiniciproducens* สายพันธุ์ LPK7 ก็เป็นอีกสายพันธุ์หนึ่งที่ถูกพัฒนาให้สามารถผลิตกรดซัคซินิคได้ในปริมาณสูง และลดการผลิตผลพลอยได้จำพวกกรดอะซิติก กรดฟอร์มิก กรดแลคติกให้ต่ำลงได้ (Oh et al., 2008)

3. *Anaerobiospirillum succiniciproducens*

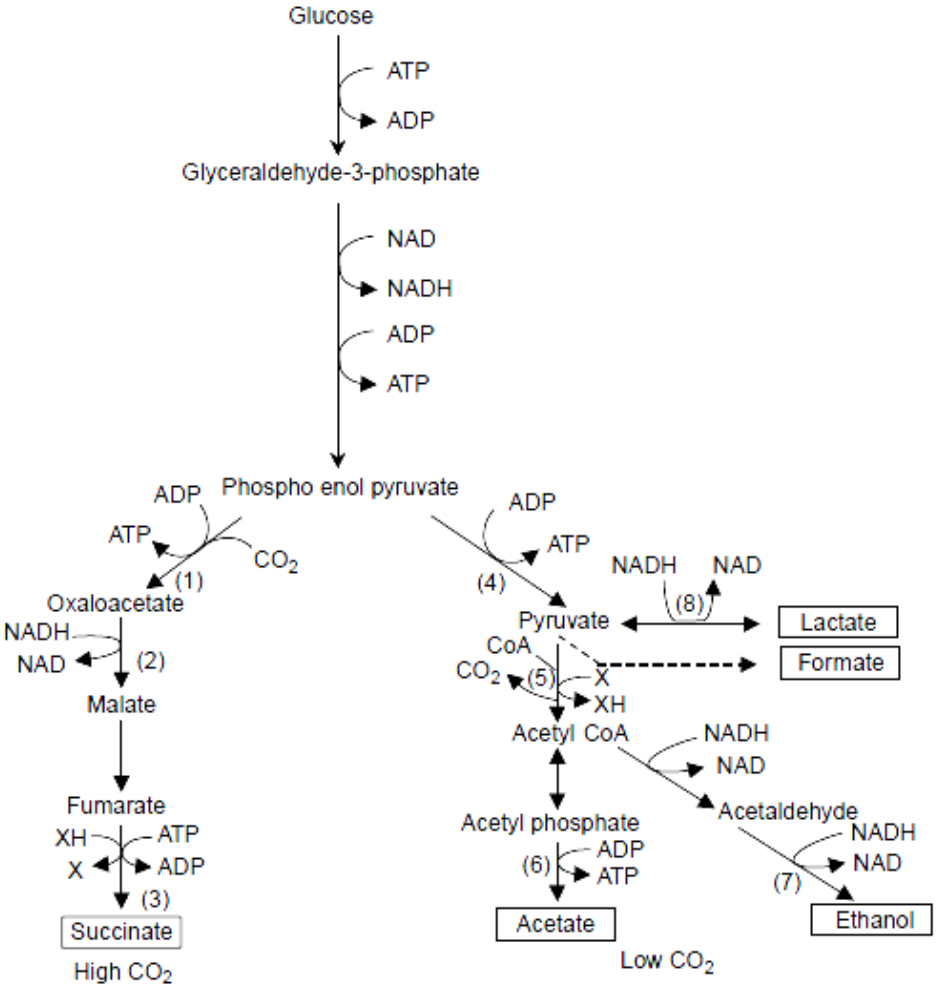
A. succiniciproducens เป็นแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากบริเวณลำคอและอุจจาระของสุนัขพันธุ์บีเกิล (Beagle dog) ซึ่งสามารถผลิตกรดซัคซินิคและกรดอะซิตริกได้เป็นผลิตภัณฑ์หลัก และสามารถผลิตผลพลอยได้จากกระบวนการหมักเป็นเอทานอลและกรดแลคติกในสภาวะที่ไม่ใช้ออกซิเจน *A. succiniciproducens* จัดเป็นแบคทีเรียที่สามารถเคลื่อนที่ได้ เป็นแบคทีเรียแกรมลบ (Song & Lee, 2006) ในการเพาะเลี้ยงด้วยกระบวนการหมักแบบไร้ออกซิเจน แบคทีเรีย *A. succiniciproducens* สามารถผลิตกรดซัคซินิคได้เป็นปริมาณสูง ในขณะที่ผลิตภัณฑ์ที่ไม่ต้องการนั้นน้อยลง (Lee et al, 2008)

4. *E. coli* ดัดแปลงพันธุกรรม

นอกจากจะสามารถใช้ *E. coli* ในกระบวนการหมักเพื่อผลิตเอทานอล กรดฟอร์มิก กรดอะซีติก และกรดแลกติกแล้วยังสามารถใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมในการใช้ *E. coli* ผลิตกรดซัคซินิคในสภาวะไม่ใช้ออกซิเจน เพื่อจะพัฒนาให้มีผลผลิตเป็นกรดซัคซินิคได้สูงกว่าแบคทีเรียที่ผลิตกรดซัคซินิคดั้งเดิม (Song & Lee, 2006) จากรายงานการศึกษาการใช้แบคทีเรีย *E. coli* ที่ผ่านการดัดแปลงพันธุกรรมในกระบวนการผลิตกรดซัคซินิคจากกากน้ำตาลพบว่า สามารถผลิตกรดซัคซินิคได้ 7.08 กรัมต่อลิตร ในการเพาะเลี้ยงโดยขวดทดลอง และเมื่อขยายขนาดการผลิตมาเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 10 ลิตร สามารถผลิตกรดซัคซินิคได้ถึง 17 กรัมต่อลิตร (Agarwal et al., 2006) การศึกษาการผลิตกรดซัคซินิคจากน้ำตาลซูโครสและกากน้ำตาลโดยใช้แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ KJ122 สามารถผลิตกรดซัคซินิคได้ถึง 56 กรัมต่อลิตรเมื่อเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 10 ลิตร (Sitha, Sunthorn, & Kaemwich, 2012)

การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตกรดซัคซินิค

กระบวนการผลิตกรดซัคซินิคของ *A. succinogenes* อาศัย Pathway phosphoenolpyruvate carboxykinase หรือที่เรียกว่า C_4 Pathway โดยใช้เอนไซม์ที่สำคัญ 4 ชนิด ด้วยกันคือ Phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPck), Malate dehydrogenase (Mdh), Fumarase (FUm) และ Fumarate dehydrogenase (FRd) (Mckinlay, Vieille, & Zeikus, 2007)



ภาพที่ 2-4 Pathway ของกระบวนการผลิตกรดซัคซินิคด้วยกระบวนการหมักโดยใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน โดย *A. succinogenes* และ *A. succiniciproducens*
(1 : Phosphoenolpyruvate carboxykinase, 2 : Malate dehydrogenase, 3 : Fumarate dehydrogenase, 4 : Pyruvate kinase, 5 : Pyruvate ferredoxin oxidoreductase, 6 : Acetate kinase, 7 : Alcohol dehydrogenase, 8 : Lactate dehydrogenase) (Zeikus et al., 1999)

การเปลี่ยน Phosphoenolpyruvate (PEP) เป็น Oxaloacetate นับเป็นกระบวนการสำคัญที่ทำให้เกิดการผลิตกรดซัคซินิคในส่วนบริเวณกระเพาะของวัว โดยอาศัยการทำงานของแบคทีเรีย ซึ่งปัจจัยสำคัญที่ควบคุมการเกิดคือ ระดับของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ เมื่อระดับของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์อยู่ในระดับที่สูง จะทำให้เอนไซม์ PEPck ทำงานและเกิดการเปลี่ยนจาก PEP มาเป็น Oxaloacetate (ภาพที่ 2-4) จากนั้น Oxaloacetate จะถูกเปลี่ยนเป็น Malate ด้วยการทำงานของเอนไซม์ Mdh จาก Malate จะถูกเปลี่ยนเป็น Fumarate ด้วยการทำงานของเอนไซม์ FUm และจะได้เป็นผลิตภัณฑ์กรดซัคซินิคในที่สุดซึ่งอาศัยการทำงานของเอนไซม์ FRd ในขณะที่ถ้าระดับของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์อยู่ในระดับที่ต่ำ จะทำให้ PEP เปลี่ยนมาเป็น Pyruvate ซึ่งจะทำให้ได้ผลพลอยได้เป็นกรดแลคติก กรดฟอร์มิก กรดอะซิติก และเอทานอล **(**Song & Lee, 2006**)**

ไอออนโลหะ (Metal ions) นับว่ามีความสำคัญต่ออัตราเมทาบอริซึมของเซลล์และกิจกรรมของเอนไซม์ (Podkovyrov & Zeikus, 1993) การศึกษาการเติมโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ในกระบวนการผลิตกรดซัคซินิคส่งผลให้มีผลผลิตที่สูงขึ้นและแบคทีเรียมีการเจริญที่ดี (Isar et al., 2006) ซึ่งเป็นผลมาจากโซเดียม (Na^+) เป็นโคแฟกเตอร์ (Cofactor) ของเอนไซม์เป็นปัจจัยสำคัญในกระบวนการนำเข้าธาตุอาหาร (Nutrient uptake) และยังเกี่ยวพันกับกระบวนการเคลื่อนที่ของเซลล์ (Cell motility) การควบคุมความเป็นกรดเบสภายในเซลล์ (Intracellulars pH regulation) (Strobel & Russel, 1991) จากการศึกษาพบว่ามีงานวิจัยที่ผลิตกรดซัคซินิคด้วยกระบวนการหมักซึ่งใช้โซเดียมคาร์บอเนตในการควบคุมระดับค่าความเป็นกรดด่างให้คงที่ (Li et al., 2010; Chen et al., 2011) นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยที่มีการใช้แมกนีเซียมคาร์บอเนต ($MgCO_3$) ในการควบคุมระดับค่าความเป็นกรดด่างให้คงที่อีกด้วย (Vlysidis, Binns, Webb, & Theodoropoulos, 2011; Li et al, 2011)

กากมันสำปะหลัง (Cassava pulp)

กากมันสำปะหลังเป็นของเหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตแป้งมันสำปะหลัง กากมันสำปะหลังโดยมีลักษณะที่ละเอียด สีขาว และมีความชื้นสูงประมาณร้อยละ 75 (ปิตุนาถ หนูแสน, 2547) กากมันสำปะหลังมักจะถูกทิ้งไว้บริเวณลานโล่งแจ้ง ซึ่งก่อให้เกิดปัญหาต่อสิ่งแวดล้อมคือปัญหาน้ำเน่าเสียที่เกิดจากการเน่าเสียของกากมันสำปะหลังและยังรบกวนผู้คนที่อยู่อาศัยบริเวณนั้นจากกลิ่นเน่าเหม็นที่เกิดขึ้น

กากมันสำปะหลังถูกนำไปใช้ประโยชน์ในการเป็นส่วนผสมของอาหารสัตว์และเมื่อนำไปตากให้แห้งสามารถนำไปทำเป็นปุ๋ยสำหรับต้นไม้ได้ องค์ประกอบของกากมันสำปะหลังนั้นยังคงมีแป้งเป็นองค์ประกอบหลักซึ่งมีอยู่ถึงร้อยละ 50 – 70 และมีไฟเบอร์อยู่ร้อยละ 20 – 30 (Ukrit,

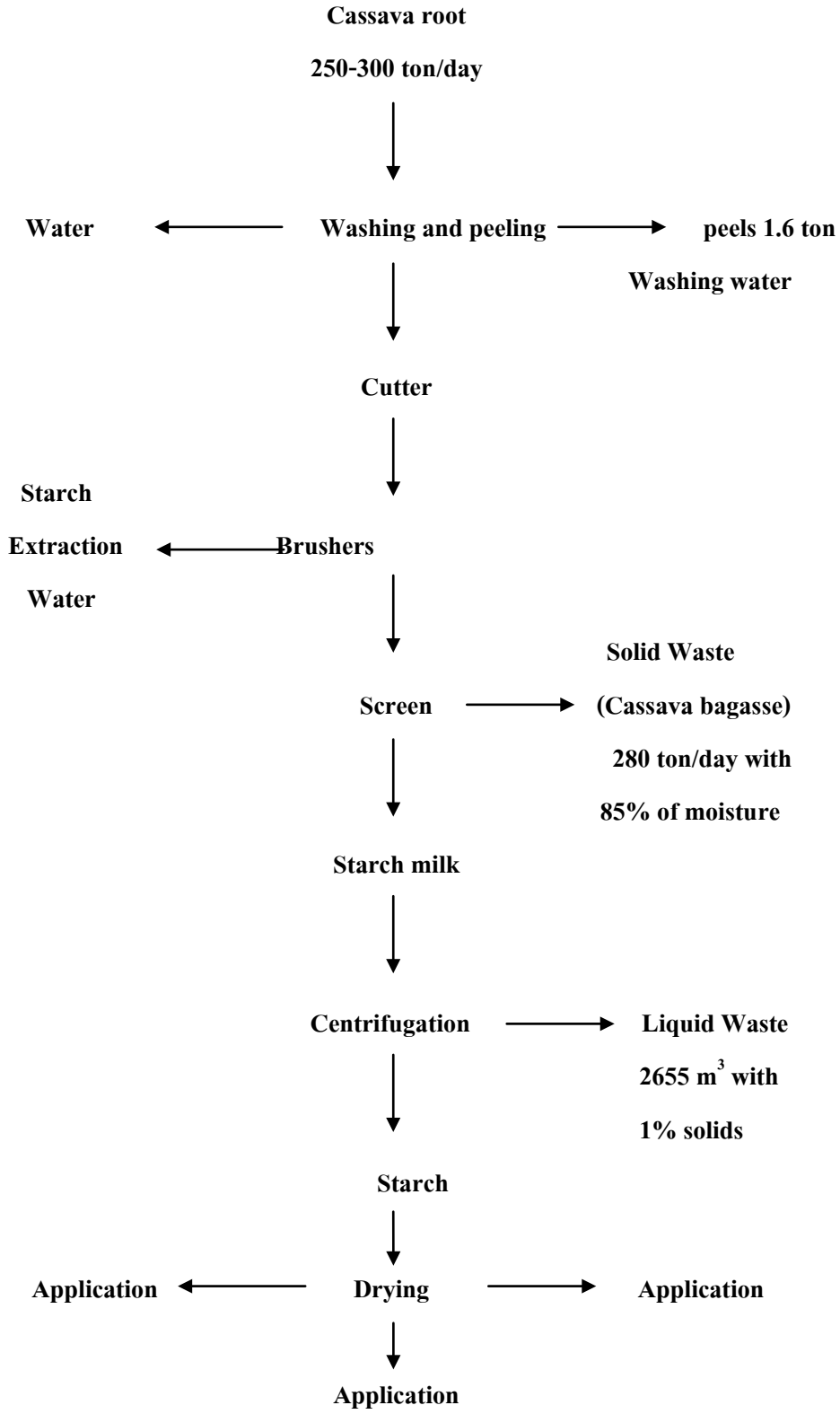
Sutipa, Lily, & Verawat, 2009) จากการที่กากมันสำปะหลังยังคงมีองค์ประกอบของแป้งเหลืออยู่มากนั้น ทำให้มีผู้ที่สนใจศึกษาการย่อยกากมันสำปะหลังให้เป็นน้ำตาลเพื่อนำไปใช้ในกระบวนการหมักเพื่อการผลิต ผลิตภัณฑ์ทางชีวภาพ (Bioproducts) การผลิตเอทานอล (Ethanol) เพื่อใช้เป็นพลังงานทดแทน (Akihiko et al, 2009) ซึ่งเป็นการใช้ประโยชน์จากกากมันสำปะหลังที่จัดเป็นชีวมวลแหล่งหนึ่งที่เป็นของเหลือทิ้งทางการเกษตร อีกทั้งยังเป็นการเพิ่มมูลค่าของกากมันสำปะหลังซึ่งเดิมมีราคาถูกอีกด้วย (Siriporn et al., 2012)

กระบวนการย่อยกากมันสำปะหลังให้เป็นน้ำตาลนั้นสามารถย่อยได้ด้วยการใช้กรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) (Teerapatr, Lerdluk, & La-aied, 2006) กรดไฮโดรคลอริก (HCl) (Sunee, Chidphong, Prodpran, & Sumate, 2004) และการย่อยด้วยเอนไซม์ ซึ่งการย่อยด้วยเอนไซม์ต้องอาศัยเอนไซม์หลายชนิดในการย่อยแป้งซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักในกากมันสำปะหลัง โดยการใช้เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส (α- amylase) และเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (Glucoamylase) นอกจากนี้อาจมีการใช้เอนไซม์เซลลูเลส (Cellulase) เพื่อย่อยเซลลูโลสซึ่งเป็นองค์ประกอบหนึ่งที่อยู่ในกากมันสำปะหลัง (Akihiko et al, 2009)

องค์ประกอบของกากมันสำปะหลัง

1. แป้ง

แป้งเป็นคาร์โบไฮเดรตที่ประกอบด้วยคาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจน ในอัตราส่วน 6:10:5 มีสูตรเคมีโดยทั่วไปคือ $(C_6H_{10}O_5)_n$ แป้งเป็นโพลิเมอร์ของกลูโคส ซึ่งประกอบด้วยหน่วยของน้ำตาลกลูโคสมาเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิก (Glycosidice linkage) ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 1 ทางด้านตอนปลายของสายโพลิเมอร์ที่มีหน่วยกลูโคสที่มีหมู่อัลดีไฮด์ (Aldehyde group) เรียกว่าปลายรีดิวซิง (Reducing end group) แป้งประกอบด้วยโพลิเมอร์ของกลูโคส 2 ชนิดคือ โพลิเมอร์เชิงเส้น (อะไมโลส) และโพลิเมอร์เชิงกิ่ง (อะไมโลเพคติน) วางตัวในแนวรัศมี แป้งจากแหล่งที่ต่างกันจะมีอัตราส่วนของอะไมโลสและอะไมโลเพกตินแตกต่างกัน (ตารางที่ 2-4) ทำให้คุณสมบัติของแป้งแต่ละชนิดต่างกัน (กล้าณรงค์ ศรีรอต และเกื้อกูล ปิยะจอมขวัญ, 2546)



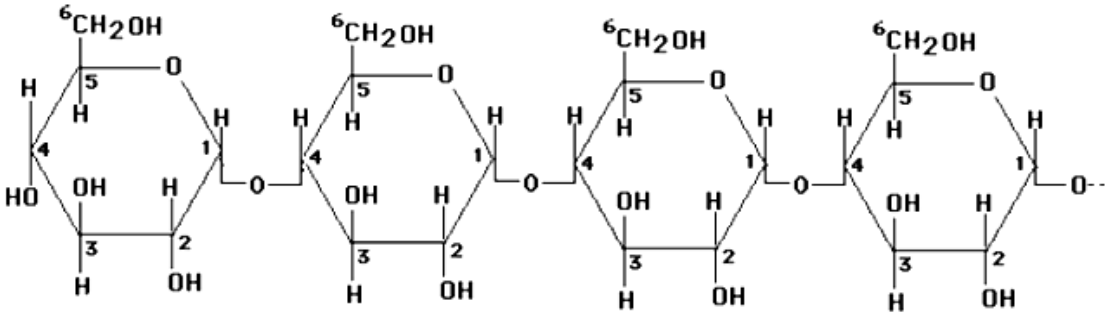
ภาพที่ 2-5 กระบวนการผลิตแป้งมันสำปะหลัง (Pandey et al., 2000)

ตารางที่ 2-4 สมบัติที่สำคัญของอะไมโลส และอะไมโลเพคติน (พักตร์ประไพ ประจำเมือง, 2546)

คุณสมบัติ	อะไมโลส	อะไมโลเพคติน
ลักษณะโครงสร้าง	สารประกอบของน้ำตาลกลูโคสเกาะกันเป็นเส้นตรง	สารประกอบของน้ำตาลกลูโคสเกาะกันเป็นกิ่งก้าน
พันธะที่จับ	α-1,4	α-1,4 และ α-1,6
ขนาด	200-2,000 หน่วยกลูโคส	มากกว่า 1,000 หน่วยกลูโคส
การละลาย	ละลายน้ำได้น้อยกว่า	ละลายน้ำได้ดี
การทำปฏิกิริยากับไอโอดีน	สีน้ำเงิน	สีแดงม่วง
การจับตัว	เมื่อให้ความร้อนแล้วทิ้งไว้จะจับตัวเป็นวุ้นและแผ่นแข็ง	ไม่จับตัวเป็นแผ่นแข็ง

1.1 อะไมโลส (Amylose)

อะไมโลส เป็นโพลิเมอร์เชิงเส้นที่ประกอบด้วยกลูโคสประมาณ 2,000 หน่วย เชื่อมต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิก (Glycosidice linkage) ชนิดแอลฟา-1,4 (α-1,4) (ภาพที่ 2-6) พบว่าในแป้งมันสำปะหลังมีปริมาณอะไมโลสร้อยละ 17 โดยน้ำหนักแห้ง



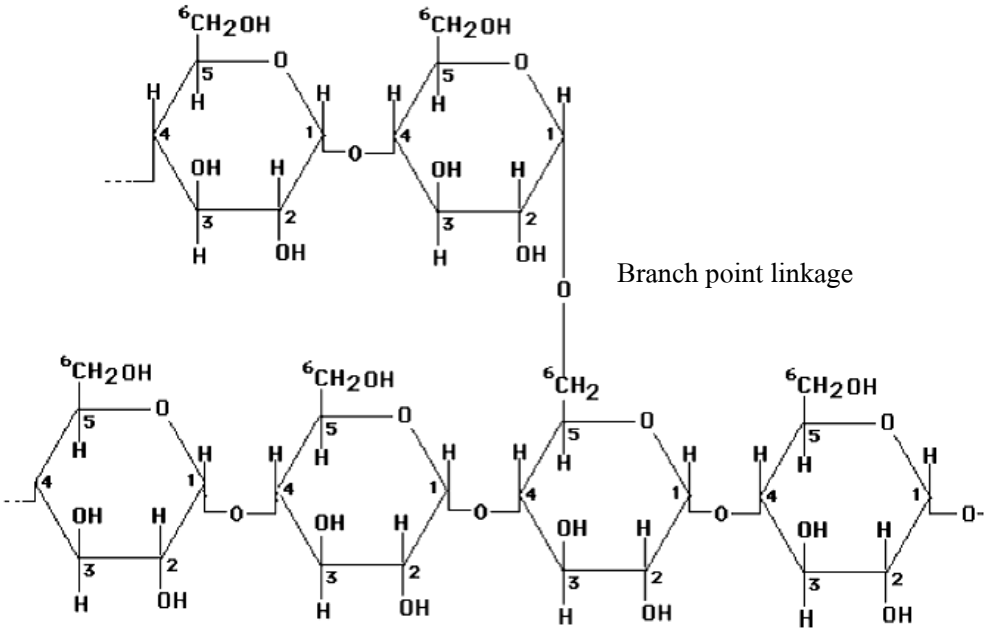
ภาพที่ 2-6 โครงสร้างของอะไมโลส (พักตร์ประไพ ประจำเมือง, 2546)

อะไมโลสสามารถรวมตัวเป็นสารประกอบเชิงซ้อนกับไอโอดีน และสารประกอบอินทรีย์อื่น ๆ เช่น บิวทานอล กรดไขมัน สารลดแรงตึงผิว ฟีนอล และไฮโดรคาร์บอน สารประกอบเชิงซ้อนเหล่านี้จะไม่ละลายน้ำ โดนอะไมโลสจะพันเป็นเกลียวล้อมรอบสารประกอบ

อินทรีย์ นอกจากนี้อะไมโลสที่รวมตัวกับไอโอดีนจะให้สีน้ำเงิน ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะที่บ่งบอกถึงแป้งที่มีองค์ประกอบของอะไมโลส

1.2 อะไมโลเพกติน (Amylopectin)

อะไมโลเพกติน เป็นโพลิเมอร์เชิงกิ่งหรือแตกแขนงของกลูโคส ส่วนที่เป็นเส้นตรงของกลูโคสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิกชนิดแอลฟา-1,4 (α-1,4) และส่วนที่เป็นกิ่งก้านสาขาที่เป็นโพลิเมอร์กลูโคสสายสั้น มีขนาดโมเลกุล (Degree of Polymerization; DP) อยู่ในช่วง 10 ถึง 60 หน่วย เชื่อมต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิกชนิด α-1,6 (ภาพที่ 2-7) พบว่าในแป้งมันสำปะหลังมีปริมาณอะไมโลเพกตินร้อยละ 83 โดยน้ำหนักแห้ง



ภาพที่ 2-7 โครงสร้างของอะไมโลเพกติน (พักตร์ประไพ ประจำเมือง, 2546)

หน่วยกลูโคสที่มีพันธะไกลโคซิดิกชนิดแอลฟา -1,6 (α-1,6) มีอยู่ประมาณร้อยละ 5 ของปริมาณหน่วยกลูโคสในอะไมโลเพกตินทั้งหมด ขนาดโมเลกุลของอะไมโลเพกตินในแป้งแต่ละชนิดจะมีค่าประมาณ 2 ล้านหน่วย อะไมโลเพกตินมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 1,000 เท่าของอะไมโลส คือ ประมาน 10^7 ถึง 10^9 ดาลตัน และมีอัตราการคืนตัวต่ำ เนื่องจากอะไมโลเพกตินมีลักษณะโครงสร้างเป็นกิ่ง

สำหรับ อะไมโลเพกตินของแป้งมันสำปะหลังสายส่วนใหญ่ประมาณร้อยละ 80-90 ประกอบด้วยสายเดี่ยว ๆ และสายที่เหลืออีกร้อยละ 10-20 จะเป็นส่วนเชื่อมของแต่ละกลุ่ม ในแต่ละกลุ่มประกอบด้วยสายประมาณ 20-25 สาย ทำให้เกิดเป็นส่วนผลึกของเม็ดแป้ง ในการจับกันเป็นกลุ่มของของอะไมโลเพกตินทำให้เกิดเป็นเกลียวคู่ (Double helix) ซึ่งช่วยให้เม็ดแป้งมีความคงทนต่อการทำปฏิกิริยาด้วยกรดและเอนไซม์ การเกิดเกลียวคู่ของอะไมโลเพกตินต้องอาศัยพันธะไฮโดรเจน และแรงวัลเดอร์วาลส์ (Van der Waals forces) ในการเชื่อมต่อกัน ทำให้ส่วนของกิ่งอะไมโลเพกตินภายในเม็ดแป้งสามารถเกิดเป็นผลึกได้ ทั้งกิ่งที่อยู่ใกล้กันในกลุ่มเดียวกัน หรือเกิดระหว่างกลุ่มใกล้เคียงกัน อะไมโลเพกตินถือว่ามีความสำคัญมากกว่าอะไมโลสทั้งด้านโครงสร้าง หน้าที่ และการนำไปใช้ ดังนั้นเมื่อมีอะไมโลเพกตินเพียงอย่างเดียวสามารถรวมตัวเพื่อสร้างเม็ดแป้งได้

2. เส้นใย

เส้นใยเป็นโพลิเมอร์ที่เป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ของพืช โดยประกอบด้วยเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ผนังเซลล์พืชแบ่งเป็น 2 ชั้นคือ

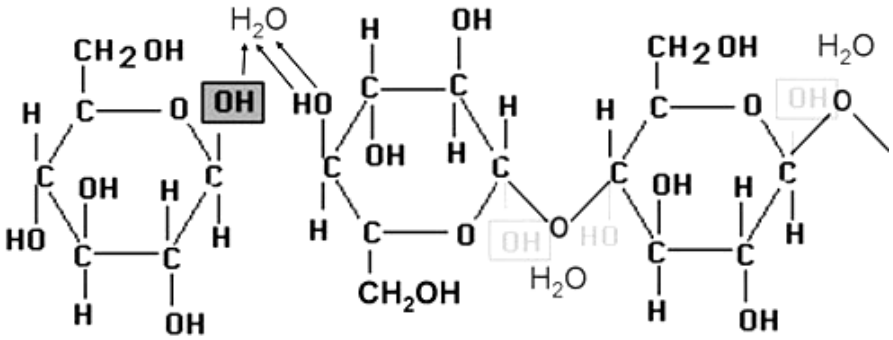
1) ผนังเซลล์ชั้นแรก (Primary cell wall) เป็นผนังเซลล์ชั้นนอกสุดประกอบด้วยเส้นใยเซลลูโลส (Cellulose microfibril) และมีโพลีแซคคาไรด์ชนิดอื่นร่วมด้วย เซลล์ที่ติดกันจะมีมิดเดิลลาเมลลา (Middle lamella) กั้น (ระยะห่างประมาณ 0.1 ถึง 0.2 ไมครอน) มิดเดิลลาเมลลาประกอบด้วยเพกตินและประจุแคลเซียม

2) ผนังเซลล์ชั้นสอง (Secondary cell wall) อยู่ชั้นในถัดจากผนังเซลล์ชั้นแรกเข้าไป ผนังเซลล์ชั้นสองจะประกอบด้วยผนังเซลล์หลาย ๆ ชั้นที่มีส่วนประกอบต่างกัน ที่เกิดจากการจัดเรียงตัวของเส้นใยเซลลูโลสที่แตกต่างกัน จับกันด้วยพันธะไฮโดรเจน นอกจากนี้ยังมีเฮมิเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบด้วย ผนังเซลล์ชั้นนี้จะหนาประมาณ 1 ถึง 3 ไมครอน ทำให้เซลล์แข็งแรง ต้านทานแรงดึงและแรงอัดได้

2.1 เซลลูโลส (Cellulose)

เซลลูโลส เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่พบมากที่สุดประมาณร้อยละ 45 ของสารอินทรีย์ทั้งหมดในธรรมชาติ ส่วนใหญ่สะสมอยู่ที่ผนังเซลล์ในพืชชั้นสูงทุกชนิด หรือวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร เช่น ฟาง ขี้เลื่อย กากมันสำปะหลัง เป็นต้น เป็นสารประกอบคาร์โบไฮเดรตที่ประกอบด้วยหน่วยย่อยของน้ำตาลกลูโคสจำนวน 1,000-10,000 โมเลกุล ต่อกันเป็นโพลิเมอร์เชื่อมกันด้วยพันธะไกลโคซิดิกชนิดเบต้า-1,4 (β-1,4) ระหว่างหมู่ไฮดรอกซิล (R-OH) โดยโมเลกุลสาย

ยาวของเซลลูโลสประกอบด้วยกลูโคส 2,000-15,000 โมเลกุล และมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 20,000-2,400,000 ดาลตัน การเรียงตัวของโมเลกุลเซลลูโลสมีลักษณะเป็นเส้นตรง ไม่มีแขนงย่อย มีสูตรเคมีทั่วไป คือ $(C_6H_{10}O_5)_n$ เมื่อ n คือ จำนวนหน่วยกลูโคสทั้งหมดที่ประกอบกันเป็นโครงสร้าง



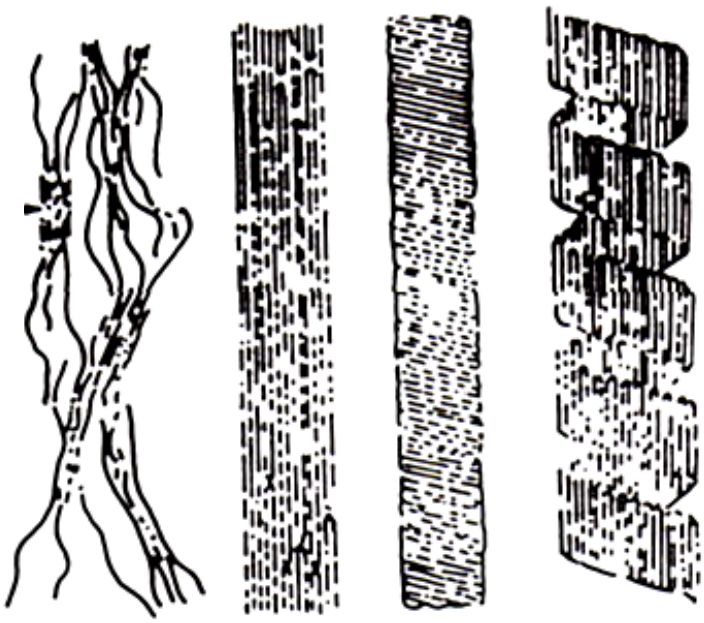
ภาพที่ 2-8 โครงสร้างของเซลลูโลส (ศศิธร ไกรฤทธิชัย, 2552)

ลักษณะโครงสร้างของเซลลูโลส เซลลูโลสมีลักษณะโครงสร้าง 3 แบบ ดังนี้ (ภาพที่ 2-9)

1) โครงสร้างแบบฟรินจ์ไมเซลล์ (Fringe micelles) ประกอบด้วยส่วนที่เป็นผลึก (Crystalline) และส่วนที่เป็นอสัณฐาน (Amorphous) (ภาพที่ 2-9ก) ส่วนที่เป็นผลึกจะเป็นบริเวณที่มีการจัดเรียงโมเลกุลอย่างเป็นระเบียบ และส่วนที่เหลือคือส่วนที่เป็นอสัณฐานจะมีการจัดเรียงโมเลกุลอย่างไม่เป็นระเบียบ หรือเป็นระเบียบน้อย

2) โครงสร้างของเซลลูโลสที่ม้วนพับไปตามแกนของเส้นใยเซลลูโลส (ภาพที่ 2-9ข)

3) โครงสร้างของเซลลูโลสที่มีลักษณะเป็นแบบริบบิ้นและม้วนเป็นเกลียว (ภาพที่ 2-9ค) โครงสร้างที่แตกต่างกัน ทั้ง 3 แบบนั้นก่อให้เกิดช่องว่างระหว่างโมเลกุล ทำให้โมเลกุลไม่ต่อเนื่อง ในธรรมชาติจึงไม่พบเซลลูโลสในรูปอิสระแต่มักรวมกับลิกนิน เฮมิเซลลูโลส แทนนิน เพนโตแซนกัม และ ไขมัน เป็นต้น (ศศิธร ไกรฤทธิชัย, 2552)



ก ข ค

ภาพที่ 2-9 เส้นใยเซลลูโลสในผนังเซลล์พืชชั้นสูง (ศศิธร ไกรฤทธิชัย, 2552)

ก . แบบ Fringe micelle

ข . แบบที่ม้วนหรือพับไปตามแกนของเส้นใยเซลลูโลส

ค . แบบริบบิ้นและม้วนเป็นเกลียว

2.2 เฮมิเซลลูโลส (Hemicellulose)

เฮมิเซลลูโลส มีสูตรโครงสร้าง คือ $[C_5(H_2O)_4]_n$ หรือ $[C_6(H_2O)_5]_n$ เป็นส่วนหนึ่งของผนังเซลล์ของพืช ปกติจะอยู่ร่วมกับเซลลูโลส และลิกนิน ประกอบด้วยโพลีแซคคาไรด์ที่มีความซับซ้อน เป็นโครงสร้างที่เหมือนกับเซลลูโลสและมีขนาดเล็กกว่าเซลลูโลส โดยทั่วไปจะเป็นโพลิเมอร์ผสมของโมโนแซคคาไรด์ต่างๆ ได้แก่ ไซโลส (Xylose) กลูโคส (Glucose) แมนโนส (Mannose) และกาแลกโตส (Galactose) เชื่อมต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิกชนิดเบต้า-1,4 (β-1,4) เฮมิเซลลูโลสจะมีน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่าเซลลูโลส ละลายในสารละลายด่างได้ดี และจะละลายได้ดีมากขึ้น เมื่อมีโซ่กิ่งมาก ๆ

2.3 ลิกนิน (Lignin)

ลิกนิน เป็นสารประกอบโพลิเมอร์อะโรมาติก (Aromatic compound) ที่ไม่มีรูปผลึกจะเกาะกันอยู่ในชั้นระหว่างเส้นใยทำหน้าที่ยึดเกาะเส้นใยเข้าด้วยกัน โครงสร้างพื้นฐานของ

ลิกนินคือ ฟีนิลโพรเพน (Phenylpropane) มีโมเลกุลที่แข็งแรงไม่ละลายน้ำ แต่สามารถละลายได้ในตัวทำละลายอินทรีย์บางชนิด ลิกนินเป็นองค์ประกอบหนึ่งในโครงสร้างของเซลล์พืชบริเวณรอบ ๆ เซลลูโลส โดยเป็นตัวยึดเกาะเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส เพื่อป้องกันเซลลูโลสจากการย่อยสลายจากจุลินทรีย์

การย่อยหรือไฮโดรไลซิส (Hydrolysis) กากมันสำปะหลัง

การย่อยหรือไฮโดรไลซิสเป็นกระบวนการเปลี่ยนโพลีแซคคาไรด์ (แป้งและเซลลูโลส) เป็นน้ำตาล โดยผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยอย่างสมบูรณ์ คือ กลูโคส ดังสมการ (1) (สิริวรรณ แก้วชิงดวง, 2554)

$$(C_6H_{10}O_5)_n + nH_2O \longrightarrow nC_6H_{12}O_6 \qquad (1)$$

การย่อยกากมันสำปะหลังสามารถทำได้ 3 วิธี คือ

1. การย่อยด้วยสารเคมี (Chemical hydrolysis)

การย่อยด้วยสารเคมี เช่น การย่อยด้วยกรด หรือการย่อยด้วยด่าง จะเกิดปฏิกิริยาทำลายพันธะไกลโคดิก ระหว่างคาร์บอนตำแหน่งที่ 1 ภายใต้สภาวะที่รุนแรง โดยผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยอย่างสมบูรณ์ คือ น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว เช่น กลูโคส

1.1 การย่อยด้วยกรด (Acid hydrolysis) อาจแบ่งได้เป็น 2 กระบวนการ คือ

1) กระบวนการที่ใช้กรดแก่ เช่น กรดไฮโดรคลอริก (Hydrocloric acid) หรือกรดซัลฟิวริกเข้มข้น (Sulfuric acid) ผลผลิตที่ได้ส่วนใหญ่เป็นน้ำตาลกลูโคส แต่ข้อเสียคือ จะต้องมีการแยกกรดออกจากน้ำตาลก่อนนำไปใช้ และการนำกรดกลับมาใช้ใหม่ รวมทั้งปัญหาการสูญเสียกรดไปกับส่วนที่ไม่ถูกย่อยสลาย และการผุกร่อนของเครื่องมือจากการใช้กรดแก่

2) กระบวนการที่ใช้กรดอ่อน เป็นการใช้กรดอ่อนที่อุณหภูมิสูงกว่า 180 องศาเซลเซียส ผลที่ได้จากการย่อย คือ เซลลูโลส ยังมีโครงสร้างเป็นเส้นใยอยู่ และวิธีการนี้จะไม่สามารถนำกรดกลับมาใช้ใหม่ได้ แต่จะถูกทำให้เป็นกลางด้วยปูนขาว หรือแคลเซียมคาร์บอเนต

1.2 การย่อยด้วยด่าง (Alkaline hydrolysis)

สารเคมีที่นิยมใช้ในการย่อย คือ สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซม์ (Sodium Hydroxide) เจือจาง เอทิลลีนไดอะมีน (Ethylenediamine) และแอมโมเนีย (Ammonia) เป็นต้น ซึ่งจะมีผลทำให้สายของโพลีแซคคาไรด์สั้นลง ปฏิกิริยานี้จะเกิดขึ้นที่อุณหภูมิ 160-180 องศาเซลเซียส และต้องการออกซิเจนในปริมาณเล็กน้อย

2. การย่อยด้วยวิธีทางกายภาพ (Physical hydrolysis)

การย่อยด้วยวิธีทางกายภาพ เช่น การใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (Sonicate) หรือการใช้รังสีไมโครเวฟ (Microwave irradiation)

Sriroth, Chollakup, Chotineeranat, Piyachomkwan, and Christopher (2000) ทำการใช้คลื่นเสียงในการย่อยสลายกากมันสำปะหลัง โดยนำกากมันสำปะหลังเข้มข้นร้อยละ 4 ปรับค่าความเป็นกรดด่างด้วย 0.05 โมลาร์โซเดียมอะซิเตรตบัฟเฟอร์ (Sodium acetate buffer) ให้ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 4.5 แล้วนำไปเขย่าในเครื่อง Sonicate เป็นเวลา 40 วินาที จากนั้นนำสารละลายแป้งที่ได้ไปกรองผ่านตะแกรงขนาด 90 เมซ แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ข้ามคืน ซึ่งได้แป้งร้อยละ 40 แล้วย่อยต่อเพื่อให้ได้น้ำตาล

Hermiati et al. (2011) ทำการย่อยคาร์โบไฮเดรตในกากมันสำปะหลังและแป้งมันสำปะหลังภายใต้การใช้รังสีไมโครเวฟ โดยใช้กากมันสำปะหลังหรือแป้งมันสำปะหลัง 1 กรัม ปรับปริมาตรเป็น 20 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น ภายใต้การใช้รังสีไมโครเวฟที่อุณหภูมิ 140 – 240 องศาเซลเซียส ปรับสภาพด้วยความร้อนเป็นเวลา 4 นาที และให้ความร้อนเป็นเวลา 5 นาที พบว่าอัตราการละลายของกากมันสำปะหลังเพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นโดยการปรับสภาพด้วยความร้อนจากรังสีไมโครเวฟ โดยที่อุณหภูมิ 220 องศาเซลเซียสมีปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากกากมันสำปะหลังและแป้งมันสำปะหลังในปริมาณที่สูงร้อยละ 28.59 และ 58.76 ตามลำดับ ซึ่งปริมาณน้ำตาลกลูโคสจากแป้งมันสำปะหลังลดลงเมื่อเพิ่มเวลาการปรับสภาพด้วยความร้อน การใช้รังสีไมโครเวฟเป็นอีกวิธีในการย่อยกากมันสำปะหลังและแป้งมันสำปะหลังเนื่องจากเป็นกระบวนการที่มีความรวดเร็ว

3. การย่อยด้วยเอนไซม์ (Enzymetic hydrolysis)

การย่อยด้วยเอนไซม์ เพื่อเปลี่ยนแป้งและเซลลูโลสให้เป็นน้ำตาลกลูโคส โดยเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยทั่วไปจะผลิตจากเชื้อราและแบคทีเรีย เอนไซม์เป็นโปรตีนชนิดหนึ่งที่สิ่งมีชีวิตสร้างขึ้นเพื่อทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาภายในเซลล์และมีความจำเพาะต่อสับสเตรท จึงทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ โดยมีผลข้างเคียงน้อย ทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีความบริสุทธิ์สูงและไม่ทำให้เกิดการผุกร่อนของเครื่องมือ (พักตร์ประไพ ประจำเมือง, 2546)

ข้อดีของการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ มีดังนี้

1. เอนไซม์สามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิต่ำ จึงเร่งปฏิกิริยาได้โดยไม่ต้องให้ความร้อนทำให้ประหยัดต้นทุนในการผลิต

2. ปฏิกิริยาที่มีเอนไซม์เป็นตัวเร่งจะเกิดได้เร็วกว่าปฏิกิริยาที่ไม่มีเอนไซม์ เนื่องจากเอนไซม์ไปลดพลังงานอิสระของการกระตุ้นของปฏิกิริยาทำให้ปฏิกิริยาถึงภาวะสมดุลได้เร็ว

3. เอนไซม์มีความจำเพาะกับสารตั้งต้น ดังนั้นผลผลิตที่ได้จะมีความบริสุทธิ์มาก

4. ไม่เกิดปฏิกิริยาข้างเคียง เนื่องจากเอนไซม์มีความจำเพาะกับสารตั้งต้น

5. เอนไซม์สามารถย่อยสลายสารที่มีโมเลกุลใหญ่ให้เล็กลงได้ตามที่ต้องการ

6. ผลิตภัณฑ์ที่ได้ไม่เปลี่ยนเป็นสารอื่น และ สามารถทำการหมักน้ำตาลที่เกิดขึ้นไปพร้อมกับการย่อยเซลลูโลสได้

7. ไม่จำเป็นต้องใช้อุปกรณ์ที่ทนต่อการกัดกร่อน

เอนไซม์ที่มีความสำคัญในการย่อยแป้งและเส้นใย เพื่อเปลี่ยนแป้งและเซลลูโลสให้เป็นน้ำตาลคือ เอนไซม์อะไมเลส และเอนไซม์เซลลูเลส

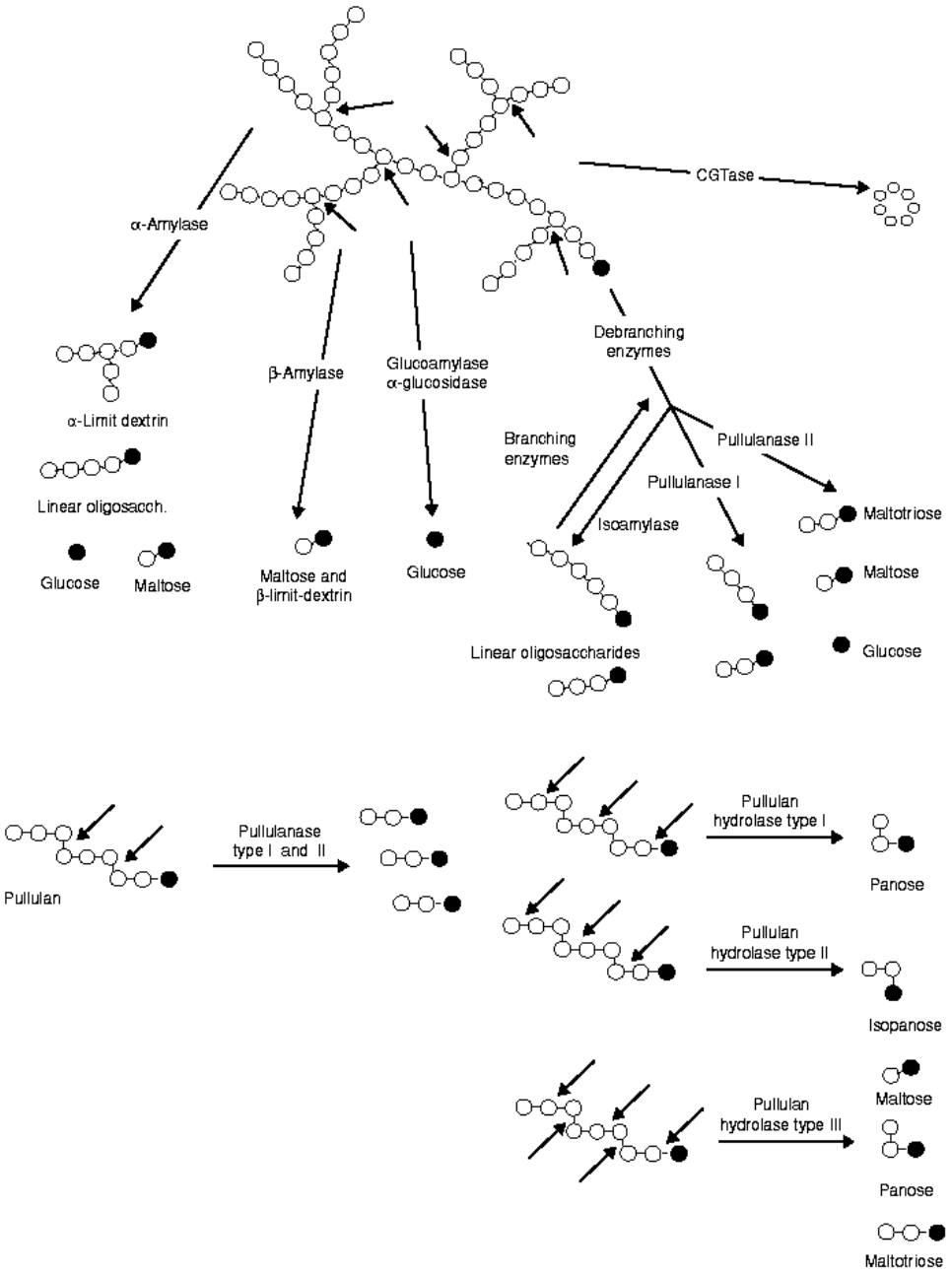
1. เอนไซม์อะไมเลส (Amylase) (Domingues & Peralta, 1993)

อะไมเลสเป็นกลุ่มของเอนไซม์ที่มีกิจกรรมการย่อยสลายโมเลกุลของแป้ง ไกลโคเจน และสารอนุพันธ์ของโพลีแซคคาไรด์เป็นหน่วยย่อยของน้ำตาล ซึ่งอาจจะอยู่ในรูปของเดกซ์ตริน (Dextrin) มอลโตส (Maltose) และกลูโคส ประเภทของน้ำตาลที่ได้ขึ้นอยู่กับชนิดของเอนไซม์ ในแต่ละกลุ่มของเอนไซม์อะไมเลสสามารถแยกออกได้เป็น 3 กลุ่มย่อยคือ

1) แอลฟา-อะไมเลส (α-amylase) พบทั่วไปทั้งในสัตว์และพืช ตลอดทั้งจุลินทรีย์หลายชนิด เอนไซม์มีบทบาทสำคัญในการย่อยแป้งให้เป็นโอลิโกแซคคาไรด์ โดยมีความเจาะจงต่อการย่อยสลายพันธะไกลโคซิดิกชนิดแอลฟา-1,4 (α-1,4) ในลักษณะตัดภายในสายโพลิเมอร์อย่างอิสระได้ผลผลิตเป็นกลูแคน (Glucan) และ Alpha-limit dextrin ที่มีหน่วยกลูโคสประมาณ 2-6 หน่วย เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสนี้เป็นผลผลิตมาจากแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* sp. ใช้ประโยชน์ในการย่อยสลายโมเลกุลใหญ่ของแป้งให้เล็กลงกลายเป็นผลิตภัณฑ์ที่เรียกว่า Liquefied starch

2) เบต้า-อะไมเลส (β-amylase) พบทั่วไปในพืชชั้นสูง เช่น ข้าวบาร์เลย์ในขณะที่กำลังงอกเป็นข้าวมอลท์ ข้าวไรย์ ถั่วเหลือง มันเทศ เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบในรูปของเอนไซม์ที่หลั่งออกมาภายนอกจุลินทรีย์หลายชนิดด้วย เอนไซม์นี้จะย่อยอะไมโลส อะไมโลเพคติน และไกลโคเจน จากด้านนอกของโมเลกุลทางด้านที่ไม่มีความสามารถในการรีดิวซ์ (Non reducing end) โดยจะย่อยสลายที่พันธะไกลโคซิดิกชนิดแอลฟา-1,4 (α-1,4) ซึ่งเป็นผลมาจากการย่อยอะไมโลสจะได้มอลโตส ส่วนการย่อยอะไมโลเพคตินจะได้น้ำตาลมอลโตสที่มีโครงร่างภายนอกต่างไปจากเดิม คือ ได้เป็นเบต้ามอลโตส และ Alpha-limit dextrin เอนไซม์นี้มีประโยชน์ต่ออุตสาหกรรมผลิตเบียร์

3) กลูโคอะไมเลสหรืออะไมโลกลูโคซิเดส (Glucoamylase หรือ amyloglucosidase) เป็นเอนไซม์ที่พบทั่วไปในจุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรีย ยีสต์ และ รา มีลักษณะสำคัญของปฏิกิริยาการย่อยแป้งคือ สามารถย่อยสลายแป้งได้ทั้ง 2 พันธะ คือ พันธะไกลโคซิดิกชนิดแอลฟา-1,4 (α-1,4) และพันธะไกลโคซิดิกชนิดแอลฟา-1,6 (α-1,6) ในการย่อยสลายพันธะไกลโคซิดิกชนิดแอลฟา-1,6 (α-1,6) จะมีอัตราการย่อยสลายได้ช้ามาก การตัดสายโพลิเมอร์ของโมเลกุลแป้งด้วยเอนไซม์กลูโคอะไมเลส จะมีกิจกรรมเหมือนกับเอนไซม์เบต้าอะไมเลส แต่จะตัดปลายสายเข้าไปทีละ 1 หน่วยของโมเลกุล จากด้านที่ไม่มีความสามารถในการรีดิวซ์ของโมเลกุลแป้ง ผลผลิตที่ได้เป็นกลูโคสอย่างเดียว ดังนั้น ผลผลิตที่ได้ส่วนใหญ่จะเป็นน้ำตาลกลูโคส ในการย่อยแป้งให้ได้โมเลกุลของกลูโคสจะต้องใช้กลูโคอะไมเลสร่วมกับแอลฟาอะไมเลส กลูโคอะไมเลสไม่ต้องการ Cofactor ในกิจกรรม เอนไซม์มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 50-110 กิโลดาลตัน มีความเสถียรที่ค่าความเป็นกรดด่าง 3.5-5 และที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส กลูโคอะไมเลสพบในจุลินทรีย์ เช่น *Aspergillus niger, A. oryzae* และ *Rhizopus* spp. เอนไซม์กลูโคอะไมเลสมีประโยชน์ในอุตสาหกรรมการผลิตน้ำตาลกลูโคสจากแป้ง และถูกใช้มากในอุตสาหกรรมการผลิตน้ำตาลฟรุคโตสด้วย



ภาพที่ 2-10 การทำงานและผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการทำงานของเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ
(พักตร์ประไพ ประจำเมือง, 2546)

2. เอนไซม์เซลลูเลส (Cellulase)

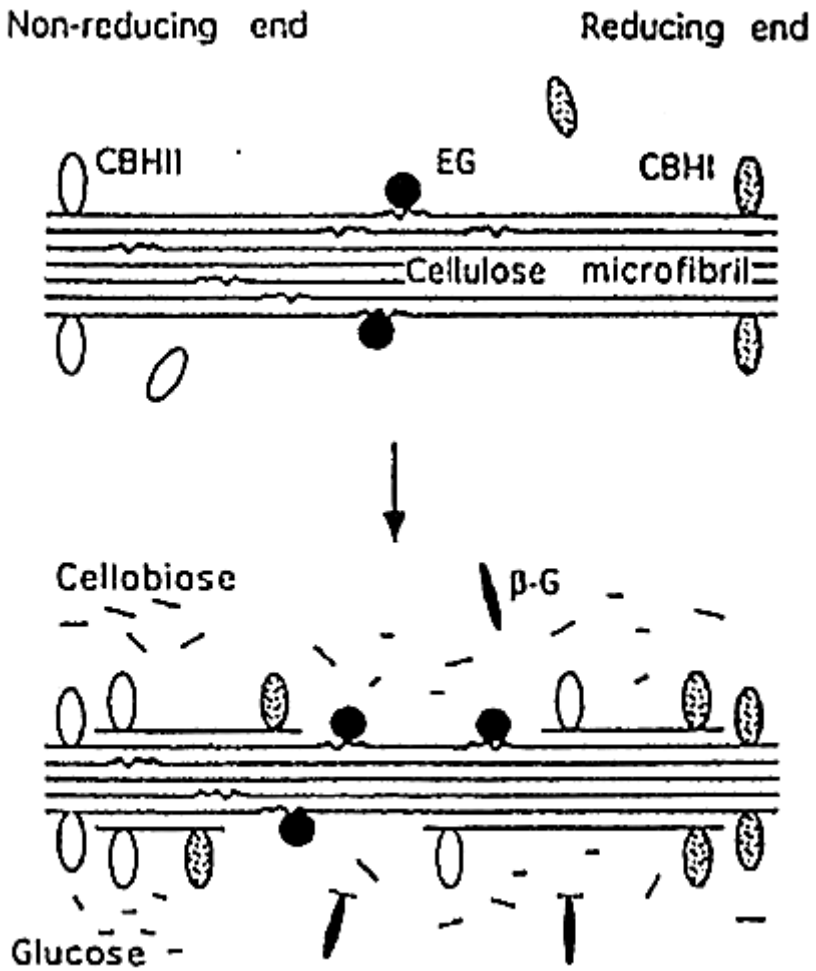
เอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยเซลลูโลส คือ เซลลูเลส เป็นเอนไซม์ที่ทำให้เกิดการสลายเซลลูโลสไปเป็นน้ำตาลกลูโคส ผลิตได้โดยสิ่งมีชีวิตทั้งพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ เช่น ข้าวมอลต์ ข้าวบาร์เลย์ ใบยาสูบ ไส้เดือนดิน ปลวก หอยทาก แบคทีเรีย และรา เป็นต้น เอนไซม์เซลลูเลสที่ได้จากจุลินทรีย์ เป็นเอนไซม์ที่ผลิตออกมาสู่ภายนอกเซลล์ (Extracellular enzyme) จัดเป็นแหล่งผลิตเอนไซม์เซลลูเลสที่ดีที่สุด เนื่องจากสะดวกต่อการสกัด สามารถผลิตได้ในปริมาณมาก ต้นทุนการผลิตต่ำ ทั้งนี้พบว่าสภาพการเพาะเลี้ยงมีผลต่อชนิดและปริมาณของเอนไซม์ที่สร้างขึ้น เช่น องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ ชนิดและปริมาณของเซลลูโลสที่ใช้ ปริมาณเกลือของโลหะต่าง ๆ สภาพความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิ และออกซิเจนเป็นต้น

เอนไซม์เซลลูเลส ทำหน้าที่ตัดพันธะไกลโคซิดิกในเซลลูโลส เป็นเอนไซม์เชิงซ้อน (Complex enzyme) ซึ่งประกอบด้วยเอนไซม์หลายชนิดทำงานร่วมกัน (ภาพที่ 2-11) ประกอบด้วยเอนไซม์ 3 กลุ่มหลัก คือ (เปี่ยมสุข พงษ์สวัสดิ์, 2551)

1) เอนโดกลูคาเนส (Endoglucanase) หรือ 1,4-beta-D-glucanohydrolase ทำหน้าที่ตัดพันธะเบต้า 1,4 ภายในสายเซลลูโลสอย่างสุ่ม โดยจะย่อยในบริเวณอสัณฐาน ทำให้เกิดปลายอิสระ ผลผลิตที่ได้คือ โอลิโกแซคคาไรด์

2) เอกโซกลูคาเนส (Exoglucanase) หรือเซลโลไบโอไฮโดรเลส ทำหน้าที่ย่อยโดยการตัดโมเลกุลจากปลายสายทั้ง 2 ด้าน โดยย่อยทีละ 2 หน่วยกลูโคสในบริเวณที่เป็นผลึก ผลิตภัณฑ์หลักคือ เซลโลไบเอส (กลูโคส เบต้า-1,4-กลูโคส)

3) เบต้า-กลูคาเนส (β-glucanase) หรือเซลโลไบเอส (Cellubiase) ทำหน้าที่ย่อยโอลิโกแซคคาไรด์สายสั้นที่เกิดจากการย่อยของเอนโดกลูคาเนส และเซลโลไบโอสที่เกิดจากเอกโซกลูคาเนสให้ได้กลูโคส เพื่อเป็นแหล่งพลังงานต่อไป



ภาพที่ 2-11 โครงสร้างของเซลลูโลส และตำแหน่งที่เอนไซม์ต่าง ๆ เข้าไปย่อยสลาย

CBH I = Exo-cellobiohydrolases

EG = Endo-glucanase

β-G = Beta-glucanase

(เปี่ยมสุข พงษ์สวัสดิ์, 2551)

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Zeikus, Jain, and Elankovan (1999) กล่าวว่า ในปัจจุบันเทคโนโลยีสีเขียวเข้ามามีบทบาทสำคัญแทนกระบวนการสังเคราะห์ทางเคมี เพื่อลดมลพิษที่ปล่อยออกสู่สิ่งแวดล้อมจากการผลิตโดยใช้ปิโตรเลียมเป็นวัตถุดิบ จึงได้มีการผลิตกรดซัคซินิคด้วยกระบวนการหมักจากแหล่งทรัพยากรธรรมชาติที่สามารถทดแทนได้ เช่น ผลิตผลทางการเกษตร จำพวกข้าวโพด มันสำปะหลัง และอ้อย เป็นต้น มาใช้เพื่อความเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมและมีต้นทุนการผลิตที่ต่ำกว่า กรดซัคซินิคจากกระบวนการหมักด้วยจุลินทรีย์ถูกนำมาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอย่างกว้างขวาง โดยการใช้เป็นสารตัวกลางและสารตั้งต้นที่สำคัญในกระบวนการผลิตในอุตสาหกรรมเคมี เช่น การผลิต N-nethyl pyrrolidone, 1,4-Butanediol, Gamma-Butyrol acetone, Adipic acid และ Tetrahydrofuran เป็นต้น ในอุตสาหกรรมยาถูกนำมาใช้ในการผลิตยาปฏิชีวนะ กรดอะมิโน และวิตามิน

นอกจากนี้ยังมีการเพิ่มผลผลิตกรดซัคซินิคด้วยการศึกษาจุลินทรีย์ที่ใช้ในกระบวนการหมักโดยอาศัยเทคนิคทางพันธุวิศวกรรม อีกทั้งยังศึกษากระบวนการหมักให้มีประสิทธิภาพสูงสุด มีผลผลิตที่ไม่ต้องการ (By product) ต่ำที่สุด

Isar, Agarwal, Saran, and Saxena (2006) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของกระบวนการหมักและการขยายขนาดการหมักของกระบวนการผลิตกรดซัคซินิคโดย *B. fragilis* เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์สูงสุด โดยทำการศึกษาปัจจัยทางกายภาพและสารอาหารในกระบวนการหมักที่สำคัญ เช่น ค่าความเป็นกรดด่าง อุณหภูมิ อัตราการกวนผสม แหล่งคาร์บอน ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น แหล่งไนโตรเจน ความเข้มข้นของไนโตรเจนเริ่มต้น ความเข้มข้นของคาร์บอเนต ปริมาณของหัวเชื้อ และเวลาในการหมัก ผลการทดลองพบว่า แบคทีเรีย *B. fragilis* สามารถผลิตกรดซัคซินิคได้ 0.70 กรัมต่อลิตร ภายในเวลา 60 ชั่วโมง แต่เมื่อทำการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมในกระบวนการหมักที่ทำการทดลองใน Anaerobic bottles คือ อาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอยด้วยแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลกลูโคสร้อยละ 1.5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร แหล่งไนโตรเจนเป็นทริปโตนร้อยละ 2.5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ไดโซเดียมคาร์บอเนตร้อยละ 1.5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7 ปริมาณหัวเชื้อร้อยละ 4 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส การกวนผสมที่ 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สามารถผลิตกรดซัคซินิคได้ 5.4 กรัมต่อลิตร และทำการขยายขนาดการผลิตในถังหมักขนาด 10 ลิตร ซึ่งมีอัตราการเติมคาร์บอนไดออกไซด์ 5.0 vvm. ความเร็วใบกวนผสม 100 รอบต่อนาที สามารถผลิตกรดซัคซินิคได้ถึง 12.5 กรัมต่อลิตร ภายในเวลา 30 ชั่วโมง ซึ่งเท่ากับ 12 เท่าของผลิตภัณฑ์ที่ยังไม่ผ่านการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสม โดยสาเหตุที่มีการเพิ่มของผลิตภัณฑ์มากขึ้น

เกิดจากการควบคุมอัตราการใส่คาร์บอนไดออกไซด์และการกวนผสมที่เหมาะสม ทำให้เวลาในกระบวนการหมักลดลง

ผลของการศึกษานี้สามารถที่จะนำไปพัฒนาสำหรับกระบวนการหมักในระดับอุตสาหกรรม

Song and Lee (2006) รายงานว่า กรดซัคซินิคเป็นสารเคมีที่มีบทบาทสำคัญมากในอุตสาหกรรมเกษตร อาหาร การผลิตยารักษาโรค และยังเป็นสารตั้งต้นที่สำคัญในกระบวนการสังเคราะห์สารเคมี เช่น Adipic acid, 1,4-Butanediol, Tetrahydrofuran, N-methyl pyrrolidinone, 2-Pyrrolidinone และ Succinate salt เป็นต้น

ปัจจุบันกรดซัคซินิคผลิตจากกระบวนการทางเคมีจากปิโตรเลียมซึ่งมีราคาสูง และเป็นแหล่งทรัพยากรที่มีอยู่อย่างจำกัด จึงมีการศึกษากระบวนการผลิตกรดซัคซินิคจากกระบวนการหมักด้วยแบคทีเรีย 4 ชนิดด้วยกัน คือ *A. succinogenes*, *M. succiniciproducens*, *A. succiniciproducens* และ Recombinant *E. coli* เพื่อให้ผลผลิตมีปริมาณสูงและมีต้นทุนการผลิตที่ต่ำลง โดยใช้แหล่งคาร์บอนเป็นทรัพยากรธรรมชาติที่สามารถทดแทนได้มาใช้แทนปิโตรเลียมในกระบวนการผลิตทางเคมี เพื่อเป็นการตระหนักถึงความใส่ใจในสิ่งแวดล้อม และเพื่ออุตสาหกรรมการผลิตกรดซัคซินิคที่ยั่งยืน

Jame, McKinlay, Vieille, and Zeikus (2007) ศึกษากระบวนการผลิตกรดซัคซินิคในระดับอุตสาหกรรม ซึ่งพบว่าปัจจุบันมีการผลิตด้วยกระบวนการทางเคมีจากปิโตรเลียม ซึ่งเมื่อคำนึงถึงต้นทุนในการผลิตที่สูงมากแล้ว ยังไม่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมอีกด้วย จึงมีการนำกระบวนการหมักด้วยแบคทีเรียมาทดแทนกระบวนการผลิตแบบดั้งเดิม ซึ่งกระบวนการผลิตให้ได้กรดซัคซินิคที่มีความเข้มข้นสูงนั้น จะต้องมีแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม และมีกระบวนการเก็บเกี่ยวการสกัดให้มีความบริสุทธิ์ที่มีประสิทธิภาพ เพื่อการนำกรดซัคซินิคไปใช้ประโยชน์ในกระบวนการผลิตสารเคมี เช่น 1,4-butanediol (BDO) ที่นำไปใช้ในการผลิตพลาสติกชีวภาพ (Biodegradable plastics) Ethylene diamine disuccinate ที่เป็น Chelator ที่สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพ Diethyl succinate ซึ่งจัดเป็นสารละลายแทนการใช้ Methylene chloride ซึ่งมีความเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม Adipic acid ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในกระบวนการผลิตในอุตสาหกรรมผ้าไนลอน นอกจากนี้ยังมีการใช้กรดซัคซินิคในอุตสาหกรรมการผลิตสารซักล้าง ใช้เป็นส่วนประกอบในอุตสาหกรรมอาหาร ใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตยารักษาโรค อีกทั้งยังพบว่ามีปริมาณการผลิตกรดซัคซินิคทางชีวภาพด้วยกระบวนการหมักที่เพิ่มสูงขึ้นเรื่อย ๆ แทนการใช้ปิโตรเลียม

Liu et al. (2008) ศึกษากระบวนการผลิตกรดซัคซินิคจากกากน้ำตาลซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีราคาถูก โดยใช้ *A. succinogenes* CGMCC1593 ในกระบวนการหมักแบบไร้อากาศ

ซึ่งมีการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับกระบวนการหมักพบว่า ความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นที่เหมาะสมคือ 65 กรัมต่อลิตร ใช้แหล่งไนโตรเจนเป็น Yeast extract ที่มีความเข้มข้นเริ่มต้น 10 กรัมต่อลิตร โดยใช้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ซึ่งทำการทดลองใน Anaerobic bottles โดยนำกากน้ำตาลมาผ่านกระบวนการย่อยด้วยกรดซัลฟิวริกแล้วนำมาใช้ในกระบวนการหมัก ผลการทดลองพบว่าสามารถผลิตกรดซัคซินิคได้ 50.6 กรัมต่อลิตร ใช้เวลาในการหมัก 60 ชั่วโมง หลังจากนั้นได้ทำการศึกษาโดยการขยายขนาดการผลิต โดยการหมักแบบกะในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่มีอัตราการกวนผสม 200 รอบต่อนาที อัตราการเติมคาร์บอนไดออกไซด์ 0.5 vvm. พบว่าสามารถผลิตกรดซัคซินิคได้ 46.4 กรัมต่อลิตร ใช้เวลาในการหมัก 48 ชั่วโมง และศึกษากระบวนการหมักแบบเติมกะ เพื่อต้องการเพิ่มผลผลิตของกรดซัคซินิค โดยใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นในระดับต่ำคือ 35 กรัมต่อลิตร และรักษาระดับน้ำตาลให้อยู่ในช่วง 10-15 กรัมต่อลิตรในระหว่างกระบวนการหมักเพื่อป้องกันการเกิดการยับยั้งของสารตั้งต้น (Substrate inhibition) ผลการทดลองพบว่าสามารถผลิตกรดซัคซินิคได้ 55.2 กรัมต่อลิตร ซึ่งสูงกว่ากระบวนการหมักแบบกะถึงร้อยละ 18.9 คิดเป็นอัตราการผลิต 1.15 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่ากระบวนการผลิตกรดซัคซินิคสามารถใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนในกระบวนการหมัก ได้วัตถุดิบที่มีราคาถูกทำให้ต้นทุนการผลิตมีราคาต่ำลงด้วย

Zheng, Dong, Sun, Ni, and Fang (2009) ศึกษากระบวนการหมักเพื่อผลิตกรดซัคซินิคจากเศษวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรโดย *A. succinogenes* CGMCC1593 มีการศึกษาการใช้แหล่งคาร์บอนที่เป็นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรพวกเปลือกข้าวโพด ซังข้าวโพด ฟางข้าว และฟางข้าวสาลีที่นำไปผ่านกระบวนการย่อยด้วยเอนไซม์ได้เป็นน้ำตาลที่นำมาใช้ในกระบวนการหมัก พบว่าการใช้น้ำตาลที่ได้จากเปลือกข้าวโพดที่ผ่านการย่อยแล้วสามารถผลิตกรดซัคซินิคได้สูงสุดคือ 33.70 กรัมต่อลิตร ใช้เวลาการหมัก 48 ชั่วโมง ภายใต้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ใน Anaerobic bottles นอกจากนี้ยังทำการศึกษาความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำตาลที่เหมาะสมสำหรับกระบวนการหมัก ซึ่งพบว่าระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมคือ 60 กรัมต่อลิตร ซึ่งสามารถผลิตกรดซัคซินิคได้ 39.4 กรัมต่อลิตร และยังพบอีกว่าถ้าระดับน้ำตาลเริ่มต้นมากเกิน 60 กรัมต่อลิตร จะทำให้การเจริญของเซลล์ลดลงและจะเกิดผลิตภัณฑ์เป็นกรดซัคซินิคลดลง เนื่องจากเกิดการยับยั้งของสารตั้งต้น (Substrate inhibition) ซึ่งก็คือระดับน้ำตาลเริ่มต้นที่มากเกินไป จากนั้นทำการศึกษาด้วยกระบวนการหมักแบบกะในถังหมักขนาด 5 ลิตร สภาวะการกวนผสม 200 รอบต่อนาที อัตราการใส่คาร์บอนไดออกไซด์ 0.1 vvm. สามารถผลิตกรดซัคซินิคได้ 45.5 กรัมต่อลิตร เวลาในการหมัก 48 ชั่วโมง และยังศึกษากระบวนการหมักแบบเติมกะเพื่อต้องการเพิ่มผลผลิตของกรดซัคซินิคโดยใช้ระดับน้ำตาลเริ่มต้นที่ 40 กรัมต่อลิตร และรักษาระดับน้ำตาลตลอดกระบวนการหมักให้อยู่

ในช่วง 10-30 กรัมต่อลิตร พบว่าสามารถผลิตกรดซัคซินิคได้ 53.2 กรัมต่อลิตร คิดเป็นอัตราการผลิตเท่ากับ 1.21 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ภายในเวลา 44 ชั่วโมง การศึกษานี้ทำให้เห็นว่าสามารถใช้เศษวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่ผ่านกระบวนการย่อยแล้วมาใช้ในกระบวนการหมักเพื่อผลิตกรดซัคซินิคได้อย่างมีประสิทธิภาพและมีราคาวัตถุดิบในการผลิตที่ถูกด้วย

Chen, Zhang, Miao, Wei, and Chen (2011) ทำการศึกษากระบวนการหมักเพื่อผลิตกรดซัคซินิคแบบ Simultaneous succharification and fermentation (SSF) ด้วยการใช้ *A.succinogenes* ATCC 55618 โดยใช้กากเรพซีดเป็นแหล่งคาร์บอน และใช้ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจน ซึ่งทดลองในถังหมักขนาด 3 ลิตร ที่อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 300 รอบต่อนาที และอัตราการใส่ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 1.0 ลิตรต่อนาที ที่ค่าความเป็นกรดด่าง 6.4 พบว่า ในกระบวนการหมักแบบกะสามารถผลิตกรดซัคซินิคได้ 15.5 กรัมต่อลิตร และกระบวนการหมักแบบเติมกะสามารถผลิตกรดซัคซินิคได้ 23.4 กรัมต่อลิตร ซึ่งแสดงว่าสามารถใช้กากเรพซีดเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตกรดซัคซินิค ซึ่งเป็นการใช้ประโยชน์จากทรัพยากรธรรมชาติที่สามารถทดแทนได้

Li et al. (2011) ทำการศึกษาการผลิตกรดซัคซินิคในระดับอุตสาหกรรมด้วยการใช้ *A. succinogenes* NJ 113 โดยใช้ Lignocelluloses hydrolysate เป็นแหล่งคาร์บอน และใช้ Waste yeast hydrolysate เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์กับแมกนีเซียมไฮดรอกไซด์แทนการใช้แมกนีเซียมคาร์บอเนต เพื่อควบคุมระดับค่าความเป็นกรดด่างในกระบวนการหมัก ทดลองในถังหมักขนาด 3 ลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อัตราการเติมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 0.5 ลิตรต่อนาที พบว่าสามารถผลิตกรดซัคซินิคได้ 56.4 กรัมต่อลิตร ซึ่งสามารถลดต้นทุนการผลิตจากแบบดั้งเดิมคือการใช้กลูโคส ยีสต์สกัด และแมกนีเซียมคาร์บอเนต ได้ถึงร้อยละ 55.9

Leung, Cheung, Zhang, Lam, and Lin (2012) ได้ศึกษาการนำของเหลือทิ้งจำพวกเศษขนมปังมาใช้ในกระบวนการผลิตกรดซัคซินิคด้วย *A. succinogenes* โดยการนำเศษขนมปังมาผ่านกระบวนการหมักด้วยเชื้อรา *Aspergillus awamori* และ *Aspergillus oryzae* ทำให้ได้เป็นน้ำตาลกลูโคสและกรดอะมิโนไนโตรเจน (Free amino nitrogen) ซึ่งจะนำไปใช้ในกระบวนการหมักเพื่อผลิตกรดซัคซินิคโดยอาศัยการทำงานของ *A. succinogenes* ในถังหมักขนาด 2.5 ลิตร ที่ควบคุมสภาวะให้มีค่าความเป็นกรดด่างด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 10 โมลาร์ และกรดซัลฟิวริก 0.05 โมลาร์ ให้มีค่าความเป็นกรดด่างในช่วง 6.6 – 6.8 ที่ความเร็วรอบ 300 รอบต่อนาที อัตราการเติมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 0.5 vvm. ผลการทดลองพบว่าสามารถผลิตกรดซัคซินิคได้ 47.3 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 60 ชั่วโมง ซึ่งงานวิจัยนี้เป็นการนำของเหลือทิ้งคือเศษขนมปังมาใช้ให้เกิดประโยชน์

Sitha, Sunthorn, and Kaemwich (2012) ศึกษาการผลิตกรดซัคซินิคจากน้ำตาลซูโครส และกากน้ำตาลโดยใช้แบคทีเรีย *E. coli* ที่ผ่านการดัดแปลงพันธุกรรม โดยการตัดต่อยีน *cscKB* และ *cscA* จาก *E. coli* K011 มาใส่ใน *E. coli* Kj122 เพื่อเพิ่มผลผลิตกรดซัคซินิคที่ผลิตจากน้ำตาลซูโครส โดยทำการทดลองในขวดทดลองแบบไร้ออกซิเจนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7.0 พบว่าสามารถผลิตกรดซัคซินิคได้ 51 กรัมต่อลิตรเมื่อใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน และใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนสามารถผลิตกรดซัคซินิคได้ 62 กรัมต่อลิตร และเมื่อทดลองในถังหมักขนาด 10 ลิตร พบว่าการใช้น้ำตาลซูโครสสามารถผลิตกรดซัคซินิคได้ 47 กรัมต่อลิตร และการใช้กากน้ำตาลสามารถผลิตกรดซัคซินิคได้ 56 กรัมต่อลิตร แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรีย *E. coli* ที่ผ่านการดัดแปลงพันธุกรรมสามารถใช้กากน้ำตาลซึ่งมีราคาถูกเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตกรดซัคซินิคได้

Jiang et al. (2013) ศึกษาการผลิตกรดซัคซินิคจาก Cellobiose โดยใช้แบคทีเรีย *A. succinogenes* งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อใช้ Cellobiose ที่ได้จากชานอ้อยมาเป็นแหล่งคาร์บอนหรือแหล่งอาหารที่มีราคาถูกและมีประสิทธิภาพ โดยการนำชานอ้อยมาผ่านกระบวนการย่อยด้วยเอนไซม์ได้เป็นน้ำตาลผสมที่มีองค์ประกอบดังนี้ Cellobiose 51.5 %, Glucose 22.8%, Arabinose 14.3 % และ Xylose 11.4 % แล้วนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในกระบวนการผลิตกรดซัคซินิค

โดยทำการทดลองในถังหมักขนาด 3 ลิตร ควบคุมสภาวะให้มีอัตราการกวนผสม 200 รอบต่อนาที อัตราการใส่ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 0.5 ลิตรต่อนาที มีการรักษาระดับค่าความเป็นกรดด่างให้เท่ากับ 6.8 โดยใช้โซเดียมคาร์บอเนตและใช้แหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลผสมที่ได้ซึ่งมีความเข้มข้น 35 กรัมต่อลิตร ซึ่งประกอบไปด้วย Cellobiose 18 กรัมต่อลิตร Glucose 8 กรัมต่อลิตร Arabinose 5 กรัมต่อลิตร และ Xylose 4 กรัมต่อลิตร ผลการทดลองพบว่าสามารถผลิตกรดซัคซินิคได้ 20 กรัมต่อลิตร คิดเป็นอัตราการผลิต 0.61 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ซึ่งแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรีย *A. succinogenes* สามารถใช้ Cellobiose ที่ได้มาจากชานอ้อยที่ผ่านกระบวนการย่อยมาแล้วได้อย่างมีประสิทธิภาพ

Chotineeranat, Pradistsuwana, Siritheerasas, and Tantratian (2004) ศึกษาการผลิตน้ำตาลกลูโคสจากกากมันสำปะหลัง โดยใช้เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส และกลูโคอะไมเลส และวิธีอัลทราฟิลเทรชั่น (Ultra filtration) พบว่าการย่อยเอนไซม์ผสมจะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มากกว่าการย่อยด้วยเพียงเอนไซม์ชนิดเดียว โดยการย่อยที่ใช้เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสร่วมกับกลูโคอะไมเลส ทำการย่อยเป็นเวลา 4 ชั่วโมง มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับร้อยละ 24.1

กรัมต่อ 100 กรัมกากมันสำปะหลัง และการใช้วิธีอัลทราฟิลเทรชั่นในการย่อยที่ความดันเฉลี่ย 98 กิโลปาสกาล อัตราการไหลผ่านแผ่นกรอง 130 มิลลิลิตรต่อวินาที และพื้นที่ตัวกรอง 28.27 ตารางเซนติเมตร พบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้นเป็น 29 กรัมต่อ 100 กรัมกากมันสำปะหลัง

Woiciechowski, Nitsche, Pandey, and Soccol (2002) ศึกษาการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์และกรดเพื่อผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ โดยใช้กากมันสำปะหลังความเข้มข้นร้อยละ 10 ย่อยด้วยกรดไฮโดรคลอริกที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5, 1.0 และ 1.5 ในอุณหภูมิที่แตกต่างกันคือ 100, 120 และ 130 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5, 10 และ 15 นาที พบว่า กรดไฮโดรคลอริกที่มีความเข้มข้นร้อยละ 1.0 ที่ย่อยด้วยอุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที สามารถย่อยได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดเท่ากับร้อยละ 62.4 และย่อยกากมันสำปะหลังความเข้มข้นร้อยละ 12 ด้วยเอนไซม์โดยการนำไปพรีทรีทเมนต์ด้วยการย่อยที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที แล้วจึงย่อยด้วยเอนไซม์ย่อยแป้ง ได้แก่ แอลฟาอะไมเลส (ค่าความเป็นกรดด่าง 6.5 อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เวลา 1 ชั่วโมง) และกลูโคอะไมเลส (ค่าความเป็นกรดด่าง 4.5 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เวลา 24 ชั่วโมง) พบว่ามีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับร้อยละ 62.5

สิริวรรณ แก้วชิงดวง (2554) ศึกษาการสภาวะการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์และกรดที่เหมาะสม เพื่อผลิตเป็นเอทานอล พบว่าการย่อยด้วยกรดซัลฟิวริกให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงกว่าการย่อยด้วยกรดฟอสฟอริก (Phosphoric acid) โดยทำการย่อยที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาทีจะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด และการย่อยด้วยเอนไซม์โดยใช้เอนไซม์เซลลูเลส ย่อยที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 72 ชั่วโมง เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสย่อยที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง และเอนไซม์กลูโคอะไมเลสย่อยที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดเท่ากับ 899.11 มิลลิกรัมต่อกรัมกากมันสำปะหลัง และเมื่อนำน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้ไปหมัก พบว่า น้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์จะให้ปริมาณเอทานอลที่สูงกว่าน้ำตาลรีดิวซ์จากการย่อยด้วยกรด

สวลี ดีประเสริฐ, ศุภชัย บุญนำมา, วิทยา บุตรทองมูล, บุปผา ชินเชิดวงศ์ และวีระ โลหะ (2555) ศึกษาการใช้ประโยชน์จากกากมันสำปะหลังเพื่อผลิตเป็นน้ำตาล โดยนำกากมันสำปะหลังที่ความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร นำมาแปรรูปเป็นน้ำตาลด้วยการดำเนินงานแบบต่อเนื่องเป็น 2 ขั้นตอน คือขั้นแรกคือใช้เอนไซม์ย่อยเซลลูโลส (CTec 2) 1 มิลลิลิตร ในการย่อยเวลา 6 ชั่วโมง ให้น้ำตาลรีดิวซ์ และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด 8.21, 15.77 กรัมต่อลิตร และขั้นตอนที่สองเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ใช้เวลาในการย่อย 2 ชั่วโมง ให้น้ำตาลรีดิวซ์ และน้ำตาลทั้งหมด 18.24, 73.56 กรัมต่อลิตร และหลังจากนั้นใช้เอนไซม์กลูโคอะไมเลส ใช้เวลาในการเปลี่ยนแป้งเป็นน้ำตาล 12 ชั่วโมงให้น้ำตาลรีดิวซ์และน้ำตาลทั้งหมดสูงที่สุด 65.80 , 73.56 กรัมต่อลิตร

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

1. วัตถุดิบ

1.1 กากมันสำปะหลัง จากโรงงาน ชอไชยวัฒน์ อุตสาหกรรม จำกัด จ. ชลบุรี

1.2 แป้งมันสำปะหลัง ตรา สามช้าง จากโรงงาน ชอไชยวัฒน์ อุตสาหกรรม จำกัด จ. ชลบุรี

2. เครื่องมือและอุปกรณ์

2.1 ขวดรูปชมพู่ (Baffled Flask) ขนาด 500 มิลลิลิตร

2.2 ถังหมัก (Fermenter) รุ่น Biostat B บริษัท B. Braun Biotech International ประเทศเยอรมนี ปริมาตรบรรจุ 5 ลิตร

2.3 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (Digital balance) รุ่น Satorius CP 2245

2.4 เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง (Digital balance) รุ่น Satorius CP 3202 S

2.5 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) รุ่น HEMLE z 233 MK-2

2.6 เครื่องกวนสาร (Vortex) รุ่น Vortex genie 2

2.7 หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave) รุ่น WACS-1045 ยี่ห้อ Daihan Scientific

2.8 เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter) รุ่น Danver basic

2.9 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectophotometer) รุ่น CECILL CE 1011

2.10 เครื่อง High pressure liquid chromatography (HPLC) รุ่น Smartline ยี่ห้อ KNAUER เยอรมันนี

2.11 ตู้บ่มแบบเขย่า รุ่น C25KC ยี่ห้อ New Brunswick Scientific สหรัฐอเมริกา

2.12 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) รุ่น WNB14 ยี่ห้อ Memmert เยอรมันนี

2.13 ถังกวนผสม 10 ลิตร จากโรงงาน ชอไชยวัฒน์ อุตสาหกรรม จำกัด จ. ชลบุรี

2.14 จุกยางเบอร์ 14

2.15 พาราฟิล์ม

2.16 ขวดทดลองขนาด 20 และ 50 มิลลิลิตร

2.17 หลอดเก็บตัวอย่างขนาด 1.5 และ 50 มิลลิลิตร

2.18 หัวกรองพร้อมเยื่อกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร

3. สารเคมี

3.1 น้ำตาลกลูโคส (Glucose lab grade) ยี่ห้อ Sigma-aldrich

3.2 น้ำตาลจากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง

3.3 ยีสต์สกัด (Yeast extract)

3.4 เปปโตน (Peptone)

3.5 ทริปโตน (Trytone)

3.6 มอลต์แอกแท็กซ์ (Malt extract)

3.7 ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)

3. 8 โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)

3. 9 แมกนีเซียมคาร์บอเนต ($MgCO_3$)

3.10 แมกนีเซียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต ($Mg(HCO_3)_2$)

3.11 โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3)

3.1 2 โซเดียมไบคาร์บอเนต (NaHCO3)

3.1 3 ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4)

3.1 4 โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (NaH_2PO_4)

3.15 โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)

3.16 แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$)

3.17 แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl)

3.18 แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$)

3.19 แอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($(NH_4)_2HPO_4$)

3. 20 ไบโอติน (Biotin)

3. 21 ยูเรีย (Urea)

3. 22 กลีเซอรอล (Glycerol lab grade) ยี่ห้อ Univa

3. 23 กากน้ำตาล (Molasses)

3. 24 เมทานอล (Methanol for HPLC)

3.2 5 กรดซัลฟิวริก (H_2SO_4 for HPLC)

3.26 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)

3.27 ซัลฟิวริก (H_2SO_4)

3.28 แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2)

3. 29 เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส (GC 358) บริษัท สยามวิกตอรี ประเทศไทย

3. 30 เอนไซม์กลูโคอะไมเลส (GC 147) บริษัท สยามวิกตอรี ประเทศไทย

3. 31 เอนไซม์เซลลูเลส (Cellulase) Biocelle Fuel บริษัท สยามวิกตอรี ประเทศไทย

4. เชื้อจุลินทรีย์

4.1 *Actinobacillus succinogenes* ATCC 55618 (เชื้อมาตรฐาน)

4.2 เชื้อแบคทีเรียหมายเลข 19 ที่ได้จากการคัดแยกจากกระเพาะกระบือ (ประภัสสร หอมแสนศรี และ อิทธิพล ภู่กระจ่าง, 2553)

วิธีการทดลอง

1. การคัดแยกแบคทีเรียจากกระเพาะกระบือที่สามารถผลิตกรดซัคซินิคได้

1.1 การเก็บตัวอย่างและการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จากกระเพาะกระบือ

1.1.1 เจาะกระเพาะอาหารส่วนรูเมน (ส่วนที่มีการหมักหญ้า) ของกระบือที่ถูกชำแหละในโรงฆ่าสัตว์ (เทศบาลเมืองชลบุรี) โดยเลือกเก็บตัวอย่างบริเวณส่วนบน ส่วนกลาง และส่วนล่างของกระเพาะอาหาร

1.1.2 เก็บตัวอย่างของเหลวที่มีส่วนของหญ้าหมักใส่ในขวดดูแรนที่มีอาหาร Enrichment medium (ภาคผนวก ก) ทั้ง 5 ขวดแล้วปิดฝาให้แน่น ปิดด้วยพาราฟิลม์อีกชั้นหนึ่ง แล้วนำไปใส่ถุงพลาสติก ปิดปากถุงให้เรียบร้อยก่อนจะนำไปยังห้องปฏิบัติการ

1.1.3 นำขวดดูแรนที่มีตัวอย่างใส่กล่องพลาสติกใส ปิดฝาและพันด้วยเทปกาว

1.1.4 เติมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เข้าไปในกล่องพลาสติกใสทางท่ออากาศเข้าเป็นเวลา 10 นาที แล้วปิดท่ออากาศเข้าออก

1.1.5 นำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง เพื่อเพิ่มจำนวนของแบคทีเรีย

1.2 การคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถเจริญในสภาวะไร้ออกซิเจนได้

1.2.1 นำตัวอย่างที่ผ่านการบ่มเพื่อเพิ่มจำนวนของเซลล์แบคทีเรียเป็นเวลา 18 ชั่วโมงมาทำการเจือจางให้เป็น 10^{-3}, 10^{-4} และ 10^{-5} ใน PBS buffer (ภาคผนวก ก) เพื่อคงสภาพของเซลล์แบคทีเรีย

1.2.2 ใช้ไมโครปิเปต ปิเปตตัวอย่างที่ทำการเจือจางใน PBS buffer เรียบร้อยแล้ว ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงในจานเพาะเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ Screening agar (ภาคผนวก ก) แล้วทำการเกลี่ยเชื้อ (Spread plate)

1.2.3 นำจานเพาะเชื้อที่ทำการเกลี่ยเชื้อเสร็จแล้ว ใส่ลงในกล่องพลาสติกใสที่มีฝาปิดมิดชิดแล้วปิดผนึกฝากล่องด้วยเทปกาว โดยที่กล่องจะมีช่องสำหรับเปิดและปิดให้อากาศเข้าออกได้สองทาง แล้วนำไปเติมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ประมาณ 10 นาที แล้วปิดช่องทางเข้าออกของก๊าซให้สนิท เพื่อให้ภายในกล่องอยู่ในสภาวะไร้ออกซิเจน

1.2.4 นำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 – 36 ชั่วโมง

1.2.5 จากนั้นทำการคัดเลือกโคโลนีของแบคทีเรียที่มีการเจริญโดยสามารถเปลี่ยนสีของอาหาร Screening agar จากสีเขียวเป็นสีเหลืองและเป็นโคโลนีเดี่ยว

1.2.6 ทำการคัดเลือกและบันทึกผล

1.3 การทดสอบการผลิตกรดซัคซินิคของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ในขวดทดลอง (Vial) ขนาด 50 มิลลิลิตร

1.3.1 เตรียมอาหาร Production medium 1 (ภาคผนวก ก) ใส่ขวดทดลองปริมาตรขวดละ 10 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.3.2 ทำการเขี่ยเชื้อแบคทีเรียจำนวน 30 ไอโซเลต (ที่คัดแยกได้จากหัวข้อ 1.2) ซึ่งอยู่ในอาหารวุ้นเอียง Screening agar เขี่ยลงในอาหาร Production medium 1 ในขวดทดลอง แล้วปิดฝาให้เรียบร้อย

1.3.3 นำตัวอย่างทั้งหมดใส่ลงในกล่องพลาสติกใสที่มีฝาปิดมิดชิดแล้วปิดผนึกฝากล่องด้วยเทปกาว โดยที่กล่องจะมีช่องสำหรับเปิดและปิดให้อากาศเข้าออกได้สองทาง จากนั้นนำไปเติมก๊าซออกซิเจนออกด้วยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ประมาณ 10 นาที แล้วปิดช่องทางเข้าออกของก๊าซให้สนิท เพื่อให้ภายในกล่องอยู่ในสภาวะไร้ออกซิเจน

1.3.4 นำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

1.3.5 จากนั้นสังเกตการขุ่นของอาหาร Production medium 1 ในขวดทดลองและนำตัวอย่างมาเตรียมสำหรับไปวิเคราะห์ผล

1.4 การทดสอบการผลิตกรดซัคซินิคของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร

1.4.1 นำหัวเชื้อ (ที่คัดแยกจากข้อ 1.3) ที่อยู่ในอาหารวุ้นเอียง Screening agar มาเขี่ยลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Production medium 1) ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.4.2 ทำการปิดปากขวดด้วยจุกยางให้สนิทและพันด้วยพาราฟิลม์

1.4.3 นำไปบ่มในตู้บ่มแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 100 รอบต่อนาที

1.4.4 เก็บตัวอย่างที่เวลา 24 ชั่วโมง เพื่อนำไปวิเคราะห์ผล

2. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดซัคซินิคของแบคทีเรียที่คัดแยกได้

2.1 การศึกษาอัตราการเจริญของของแบคทีเรียหมายเลข 37

2.1.1 นำหัวเชื้อร้อยละ 5 โดยปริมาตรต่อปริมาตร (ภาคผนวก ก) ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Production medium 1) ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นทำการปิดปากขวดด้วยจุกยางพอสนิท

2.1 .2 นำมาเติมแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์เพื่อให้เกิดสภาวะไร้อากาศ โดยต่อสายแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ผ่านตัวกรองอากาศเข้ากับสายยางที่ต่อกับก้นขวดรูปชมพู่ เปิดแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์พร้อมกับคลายที่หนีบสายยางออกเพื่อให้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์เข้าไปในขวดรูปชมพู่ แล้วคลายจุกยางเล็กน้อย ทำการอัดแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์เป็นเวลา 1 นาที

2.1.3 ปิดที่หนีบสายยางพร้อมกับปิดจุกยางให้แน่นแล้วนำพาราฟิล์มมารัดปากขวดกับจุกยางให้แน่น

2.1.4 นำไปบ่มในตู้บ่มแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 100 รอบต่อนาที

2.1.5 เก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 3, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42 และ 48 ชั่วโมง เพื่อนำไปวิเคราะห์ผล

2.2 การศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดซัคซินิคของแบคทีเรียหมายเลข 37

2.2.1 เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ (Production medium 1) ซึ่งจะมีแหล่งไนโตรเจนความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร ที่แตกต่างกัน 7 ชนิด คือ (1) Yeast extract (2) Peptone (3) Malt extract (4) Urea (5) NH_4Cl (6) $(NH_4)_2HPO_4$ (7) $(NH_4)SO_4$ และมีอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ใส่แหล่งไนโตรเจนใดเลยเป็นตัวควบคุม

2.2.2 ปรับค่าความเป็นกรดด่างให้เท่ากับ 6.5

2.2.3 นำอาหารที่ได้ปริมาตร 95 มิลลิลิตรใส่ในขวดรูปชมพู่ที่ต่อกับสายยางพร้อมที่หนีบแล้ว จากนั้นปิดปากขวดด้วยถุงพลาสติกรัดหนังยาง

2.2.4 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2.2.5 นำหัวเชื้อร้อยละ 5 โดยปริมาตรต่อปริมาตร ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นทำการปิดปากขวดด้วยจุกยางพอสนิท

2.2.6 นำมาเติมแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์เพื่อให้เกิดสภาวะไร้อากาศ โดยต่อสายแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ผ่านตัวกรองอากาศเข้ากับสายยางที่ต่อกับก้นขวดรูปชมพู่ เปิดแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์พร้อมกับคลายที่หนีบสายยางออกเพื่อให้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์เข้าไปในขวดรูปชมพู่ แล้วคลายจุกยางเล็กน้อย ทำการเติมแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์เป็นเวลา 1 นาที

2.2.7 ปิดที่หนีบสายยางพร้อมกับปิดจุกยางให้แน่นแล้วนำพาราฟิล์มมารัดปากขวดกับจุกยางให้แน่น

2.2.8 นำไปบ่มในตู้บ่มแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 100 รอบต่อนาที

2.2.9 เก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 6, 12, 18 และ 24 ชั่วโมง เพื่อนำไปวิเคราะห์ผล

2.3 การเปรียบเทียบการผลิตกรดซัคซินิคของแบคทีเรียหมายเลข 37 และเชื้อมาตรฐาน

2.3.1 นำหัวเชื้อร้อยละ 5 โดยปริมาตรต่อปริมาตร ของเชื้อมาตรฐานใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Production medium1) ที่นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นทำการปิดปากขวดด้วยจุกยางพอสนิท

2.3.2 นำมาเติมแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์เพื่อให้เกิดสภาวะไร้อากาศ โดยต่อสายแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ผ่านตัวกรองอากาศเข้ากับสายยางที่ต่อกับก้นขวดรูปชมพู่ เปิดแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์พร้อมกับคลายที่หนีบสายยางออกเพื่อให้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์เข้าไปในขวดรูปชมพู่ แล้วคลายจุกยางเล็กน้อย ทำการเติมแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์เป็นเวลา 1 นาที

2.3.3 ปิดที่หนีบสายยางพร้อมกับปิดจุกยางให้แน่นแล้วนำพาราฟิล์มมารัดปากขวดกับจุกยางให้แน่น

2.3.4 นำไปบ่มในตู้บ่มแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 100 รอบต่อนาที

2.3.5 เก็บตัวอย่างที่เวลา 24 ชั่วโมง เพื่อนำไปวิเคราะห์ผล

2.3.6 ทำการทดลองซ้ำโดยเปลี่ยนเป็นแบคทีเรียหมายเลข 37 ที่คัดแยกได้จากการทดลองนี้

2.4 การศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดซัคซินิคของแบคทีเรียหมายเลข 37

2.4.1 เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อตามสูตรอาหาร Production medium 2 (ภาคผนวก ก) ซึ่งจะมีแหล่งคาร์บอนความเข้มข้น 25 กรัมต่อลิตร ที่แตกต่างกัน 3 ชนิด คือ น้ำตาลกลูโคสผง กลีเซอรอล และ น้ำตาลที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง

2.4.2 ปรับค่าความเป็นกรดด่างให้เท่ากับ 6.9

2.4.3 นำอาหารที่ได้ปริมาตร 95 มิลลิลิตรใส่ในขวดรูปชมพู่ที่ต่อกับสายยางพร้อมที่หนีบแล้ว จากนั้นปิดปากขวดด้วยถุงพลาสติกรัดหนังยาง

2.4.4 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2.4.5 นำหัวเชื้อร้อยละ 5 โดยปริมาตรต่อปริมาตร ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นทำการปิดปากขวดด้วยจุกยางพอสนิท

2.4.6 นำมาเติมแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์เพื่อให้เกิดสภาวะไร้อากาศ โดยต่อสายแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ผ่านตัวกรองอากาศเข้ากับสายยางที่ต่อกับก้นขวดรูปชมพู่ เปิดแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์พร้อมกับคลายที่หนีบสายยางออกเพื่อให้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์เข้าไปในขวดรูปชมพู่ แล้วคลายจุกยางเล็กน้อย ทำการเติมแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์เป็นเวลา 1 นาที

2.4.7 ปิดที่หนีบสายยางพร้อมกับปิดจุกยางให้แน่นแล้วนำพาราฟิล์มมารัดปากขวดกับจุกยางให้แน่น

2.4.8 นำไปบ่มในตู้บ่มแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียส ความเร็ว 100 รอบต่อนาที

2.4.9 เก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 6, 12, 18 และ 24 ชั่วโมง เพื่อนำไปวิเคราะห์ผล

2.5 การเปรียบเทียบแหล่งคาร์บอเนตในสูตรอาหารสำหรับการผลิตกรดซัคซินิค

2.5.1 เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ (Production medium 2) ซึ่งมีแหล่งคาร์บอเนตความเข้มข้น 12.5 กรัมต่อลิตร ที่แตกต่างกัน 4 ชนิด คือ แมกนีเซียมคาร์บอเนต ($MgCO_3$) แมกนีเซียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต ($Mg(HCO_3)_2$) โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) และ โซเดียมไบคาร์บอเนต ($NaHCO_3$)

2.5.2 ปรับค่าความเป็นกรดด่างให้เท่ากับ 6.9

2.5.3 นำอาหารที่ได้ปริมาตร 95 มิลลิลิตรใส่ในขวดรูปชมพู่ที่ต่อกับสายยางพร้อมที่หนีบแล้ว จากนั้นปิดปากขวดด้วยถุงพลาสติกรัดหนังยาง

2.5.4 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2.5.5 นำหัวเชื้อร้อยละ 5 โดยปริมาตรต่อปริมาตร ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นทำการปิดปากขวดด้วยจุกยางพอสนิท

2.5.6 นำมาเติมแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์เพื่อให้เกิดสภาวะไร้อากาศ โดยต่อสายแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ผ่านตัวกรองอากาศเข้ากับสายยางที่ต่อกับก้นขวดรูปชมพู่ เปิดแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์พร้อมกับคลายที่หนีบสายยางออกเพื่อให้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์เข้าไปในขวดรูปชมพู่ แล้วคลายจุกยางเล็กน้อย ทำการเติมแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์เป็นเวลา 1 นาที

2.5.7 ปิดที่หนีบสายยางพร้อมกับปิดจุกยางให้แน่นแล้วนำพาราฟิล์มมารัดปากขวดกับจุกยางให้แน่น

2.5.8 นำไปบ่มในตู้บ่มแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียส ความเร็ว 100 รอบต่อนาที

2.5.9 เก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 6, 12, 18 และ 24 ชั่วโมง เพื่อนำไปวิเคราะห์ผล

3. การศึกษาการผลิตกรดซัคซินิคแบบกะ (Batch) ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับถังหมัก

3 .1 เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 4 ลิตร ตามสูตรอาหาร ถังหมัก 1, 2, 3, 4 (ตารางที่ 3-1) แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3.2 เตรียมแมกนีเซียมคาร์บอเนตโดยละลายในน้ำแล้วนำใส่ในถังหมักแล้วปิดฝาถัง

3.3 จัดเตรียมอุปกรณ์ของถังหมักให้เรียบร้อยแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3.4 เมื่อทำการนึ่งฆ่าเชื้อถังหมักเรียบร้อยแล้วนำถังหมักมาเชื่อมต่อกับเครื่องควบคุมโดยตั้งค่า (Set points) ให้ควบคุมอุณหภูมิเท่ากับ 39 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 6.9

3.5 นำอาหารเลี้ยงเชื้อ และน้ำตาลกลูโคสที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วใส่ในถังหมัก

3.6 นำหัวเชื้อสูตร 1 (ภาคผนวก ก) มาใส่ในถังหมักที่มีอาหารสูตร ถังหมัก 1, 2, 3 และนำหัวเชื้อสูตร 2 (ภาคผนวก ก) มาใส่ในถังหมักที่มีอาหารสูตร ถังหมัก 4 (ตารางที่ 3-1)

3.7 ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 36 ชั่วโมง โดยเก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 3, 6, 9, 12, 16, 20, 24, 28, 32 และ 36 ชั่วโมง เพื่อนำไปวิเคราะห์ผล

ตารางที่ 3-1 สภาวะการผลิตกรดซัคซินิคแบบกะ (Batch) ที่ทำการเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 5 ลิตร

สภาวะการหมัก	**ถังหมัก 1**	**ถังหมัก 2**	**ถังหมัก 3**	**ถังหมัก 4**
องค์ประกอบ	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)
NaCl	0.75	1.5	1.8	1.8
Mg_2Cl	0.25	0.5	0.6	0.6
$CaCl_2$	0.2	0.4	0.48	0.48
K_2HPO_4	1	2	2.4	2.4
KH_2PO_4	1.5	3	3.6	3.6
Na_2HPO_4	1	2	2.4	2.4
NaH_2PO_4	1.5	3	3.6	3.6
Yeast extract	10	20	24	24
Biotin	10 mg.	20 mg.	24 mg.	24 mg.
Molasses	25	40	40	40
Glucose	50	100	100	100
$MgCO_3$	25	50	50	50
pH	6.9	6.9	6.9	6.9
Temp. (^oC)	39	39	39	39
CO_2 (vvm.)	0.5	0.5	0.5	0.5
Speed motor (rpm.)	(0-2 h. = 200, 2-12 h. = 300, 12-36 h. = 400)	(0-6 h. = 400, 6-12 h. = 550, 12-36 h. = 500)	(0-6 h. = 400, 6-36 h. = 550)	(0-6 h. = 400, 6-36 h. = 550)
Inoculum (%v/v)	5	5	5	10
Time (h.)	36	36	36	36

4. การศึกษาเทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบหลายกะลำดับต่อเนื่อง (Multiple sequential batch) ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

ทำการเตรียมสูตรอาหาร และสภาวะที่ดีที่สุดที่ได้จากการทดลองหัวข้อที่ 3 ดำเนินการเพาะเลี้ยงตามขั้นตอนเดียวกัน เพื่อทำการเพาะเลี้ยงแบบกะครั้งที่ 1 เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง

จากนั้นทำการถ่ายน้ำหมักออก เหลือไว้เพียง 200 มิลลิลิตร (คิดเป็นร้อยละ 5 โดยปริมาตรต่อปริมาตรของ 4 ลิตร) เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อเริ่มต้นของการเพาะเลี้ยงแบบกะครั้งต่อไป จากนั้นเติมอาหารชุดใหม่ที่ส่วนประกอบและความเข้มข้นเท่าเดิม ปริมาตร 3,800 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงตามปกติ เมื่อครบตามระยะเวลาการเพาะเลี้ยงที่กำหนดจึงทำซ้ำอีก 1 ครั้ง (รวมทั้งสิ้น 3 ครั้ง) เพื่อเป็นการศึกษาว่าสามารถให้ผลผลิตของกรดซัคซินิคในการต่อเชื้อแต่ละครั้งให้ความแตกต่างกันหรือไม่

5. การศึกษาการใช้กากมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตกรดซัคซินิค

5.1 การศึกษาการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดซัลฟิวริก

ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในกระบวนการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดที่อุณหภูมิ 60, 100 และ 120 องศาเซลเซียส และศึกษาความเข้มข้นของกรดซัลฟิวริกที่เหมาะสมในการย่อยกากมันสำปะหลังที่ความเข้มข้น 0, 0.2, 0.4, 0.6, 1.0 และ 3.0 โมลาร์ วิธีการทดลองเริ่มจากการเตรียมตัวอย่างกากมันสำปะหลังความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร โดยชั่งกากมันสำปะหลัง 10.7 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร จากนั้นใส่กรดซัลฟิวริกที่ความเข้มข้นแตกต่างกันให้มีปริมาตรเท่ากับ 100 มิลลิลิตร นำขวดรูปชมพู่ไปทดลองที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ และที่อุณหภูมิ 100 และ 120 องศาเซลเซียสในหม้อหม้อนึ่งความดันไอสูง เป็นเวลา 30 นาที ทุกพารามิเตอร์จะทำการทดลอง 3 ซ้ำ เพื่อหาค่าเฉลี่ย ทำการเก็บตัวอย่างโดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 9,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสที่ได้มาปรับค่าความเป็นกรดด่างให้เป็นกลางก่อนนำไปวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลกลูโคส

5.2 การศึกษาการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์

เตรียมตัวอย่างกากมันสำปะหลังความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร โดยชั่งกากมันสำปะหลัง 10.7 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วใส่น้ำกลั่นให้มีปริมาตรเท่ากับ 100 มิลลิลิตร ซึ่งในแต่ละการทดลองจะมีขั้นตอนในการย่อยด้วยเอนไซม์ดังนี้

1. เอนไซม์เซลลูเลส (Biocelle Fuel) ความเข้มข้น 0.05 มิลลิลิตรต่อกรัมเซลลูโลส ที่สภาวะความเป็นกรดด่างเท่ากับ 4.8 แช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
2. เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส (GC 358) ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยน้ำหนัก ที่สภาวะค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 6.5 แช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง
3. เอนไซม์กลูโคอะไมเลส (GC 147) ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 โดยน้ำหนัก ที่สภาวะค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 4.5 แช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 ชั่วโมง

ในการทดลองจะแบ่งเป็น 8 ชุดการทดลองดังตาราง 3-2

ตารางที่ 3-2 ชุดการทดลองการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์

ชุดการทดลอง	**กระบวนการย่อย**
1. Ce	ย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส
2. Ce, A	ย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส และ แอลฟาอะไมเลส
3. Ce, A, G	ย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส แอลฟาอะไมเลส และ กลูโคอะไมเลส
4. A	ย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส
5. G	ย่อยด้วยเอนไซม์กลูโคอะไมเลส
6. A, G	ย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส และ กลูโคอะไมเลส
7. A, G, Ce	ย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส กลูโคอะไมเลส และ เซลลูเลส
8. A, G + Ce	ย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส กลูโคอะไมเลส แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเก็บส่วนใสไปวิเคราะห์ปริมาณกลูโคส ต่อจากนั้นนำกากมันสำปะหลังที่เหลือมาย่อยต่อด้วยเอนไซม์เซลลูเลส

ในการทดลองปรับค่าความเป็นกรดด่างด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 1 โมลาร์ และสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 โมลาร์ ทำการกวนผสมทุก ๆ 1 ชั่วโมง โดยทุกชุดการทดลองจะทำการทดลอง 3 ซ้ำ เพื่อหาค่าเฉลี่ย แล้วเก็บตัวอย่างนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 9,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อนำส่วนใสไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกลูโคส

5.3 การศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์

5.3.1 การศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์เซลลูเลส

เตรียมตัวอย่างกากมันสำปะหลังความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร โดยชั่งกากมันสำปะหลัง 1,070 กรัม ใส่ในถังกวน แล้วใส่น้ำให้มีปริมาตรเท่ากับ 10 ลิตร กวนผสมให้เข้ากันแล้วนำไปปรับค่าความเป็นกรดด่างให้เท่ากับ 4.8 จากนั้นนำไปใส่ในถังกวนขนาด 10 ลิตร เปิดสวิตซ์มอเตอร์ใบกวนและควบคุมอุณหภูมิที่ 55 องศาเซลเซียส จากนั้นใส่เอนไซม์เซลลูเลส (Biocelle Fuel) ความเข้มข้น 0.05 มิลลิลิตรต่อกรัมเซลลูโลส ทำการเก็บตัวอย่างทุก ๆ 2 ชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

5.3.2 การศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์กลูโคอะไมเลส

เตรียมตัวอย่างกากมันสำปะหลังความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร โดยชั่งกากมันสำปะหลัง 1,070 กรัม ใส่ในถังแล้วใส่น้ำกลั่นให้มีปริมาตรเท่ากับ 10 ลิตร กวนผสมให้เข้ากันแล้วนำไปปรับค่าความเป็นกรดด่างให้เท่ากับ 4.8 นำไปใส่ในถังหมักขนาด 10 ลิตร เปิดสวิตซ์มอเตอร์ใบกวนและควบคุมอุณหภูมิที่ 55 องศาเซลเซียส จากนั้นใส่เอนไซม์เซลลูเลส ความเข้มข้น 0.05 มิลลิลิตรต่อกรัมเซลลูโลส ทำการย่อยเป็นเวลา 6 ชั่วโมง เสร็จแล้วนำออกมาใส่ถังเพื่อเตรียมสำหรับกระบวนการย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส

นำตัวอย่างที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสแล้วมาทำการปรับค่าความเป็นกรดด่างให้เท่ากับ 6.5 ทำการกวนผสมให้เข้ากันแล้วนำใส่ถังหมัก ทำการเพิ่มอุณหภูมิให้เท่ากับ 85 องศาเซลเซียส เติมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสความเข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยน้ำหนัก ทำการย่อยเป็นเวลา 3 ชั่วโมง เสร็จแล้วนำออกมาใส่ถังเพื่อเตรียมสำหรับกระบวนการย่อยด้วยเอนไซม์กลูโคอะไมเลส

นำตัวอย่างที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสแล้วมาทำการลดอุณหภูมิให้ได้ 65 องศาเซลเซียสและปรับค่าความเป็นกรดด่างให้เท่ากับ 4.5 ทำการกวนผสมให้เข้ากันแล้วนำใส่ถังหมัก เปิดสวิตซ์มอเตอร์ใบกวน รักษาอุณหภูมิให้เท่ากับ 85 องศาเซลเซียส เติมเอนไซม์กลูโคอะไมเลสความเข้มข้นร้อยละ 0.2 โดยน้ำหนัก ทำการเก็บตัวอย่างทุก ๆ 2 ชั่วโมงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

5.4 การผลิตกรดซัคซินิคจากกากมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์

ทำการเตรียมสูตรอาหารและสภาวะตามหัวข้อที่ 4 แต่ใช้น้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนในการหมัก (ภาคผนวก ก) ดำเนินการเพาะเลี้ยงตามขั้นตอนเดียวกันเพื่อทำการเพาะเลี้ยงแบบกะครั้งที่ 1 เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการถ่ายน้ำหมักออก เหลือไว้เพียง 200 มิลลิลิตร (คิดเป็นร้อยละ 5 โดยปริมาตรต่อปริมาตรของ 4 ลิตร) เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อเริ่มต้นของการเพาะเลี้ยงแบบกะครั้งต่อไป จากนั้นเติมอาหารชุดใหม่ที่ส่วนประกอบและความเข้มข้นเท่าเดิม ปริมาตร 3,800 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงตามปกติ เมื่อครบตามระยะเวลาการเพาะเลี้ยงที่กำหนดจึงทำซ้ำอีก 1 ครั้ง (รวมทั้งสิ้น 3 ครั้ง)

การวิเคราะห์ผล

1. วิเคราะห์การเจริญของเชื้อจุลินทรีย์

นำตัวอย่างน้ำหมักใส่ลงในหลอดทดลอง ผสมให้เข้ากัน จากนั้นวัดด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร (OD_{660}) นำมาคำนวณเป็นค่าความขุ่นที่แท้จริง ดังนี้

ค่าความขุ่น = ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร x อัตราการเจือจาง

(ในกรณีที่ความเข้มข้นมากเกินไป ให้เจือจางด้วยน้ำกลั่นจนมีความเข้มข้นที่เหมาะสม คือให้มีค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 0.1-0.8)

2. วิเคราะห์กรดซัคซินิค กรดอื่น ๆ และน้ำตาล

เก็บตัวอย่างที่ได้จากการหมักมาทำการปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วถ่ายส่วนใสเพื่อนำไปกรองด้วยตัวกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร ใส่ลงในขวดวัดตัวอย่างก่อนจะนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง High pressure liquid chromatography (HPLC) รุ่น Smartline ยี่ห้อ KNAUER ประเทศเยอรมันนี โดยใช้คอลัมน์ Eurokat H มีความยาว 300 มิลลิเมตรและเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 8 มิลลิเมตร ตัววัดแบบ Refractive Index (RI Detector) โดยใช้สารชะ (Mobile phase) คือ กรดซัลฟิวริกความเข้มข้น0.01 นอร์มอล อัตราการไหล 0.6 มิลลิลิตรต่อนาที ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส

3. วิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง

เก็บตัวอย่างที่ได้จากการหมักปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดเก็บตัวอย่างที่ผ่านการชั่งน้ำหนักไว้เรียบร้อยแล้ว จากนั้นนำมาทำการปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วเทส่วนใสทิ้ง จากนั้นทำการล้างเอาองค์ประกอบอื่น ๆ ออกโดยการเติมน้ำกลั่นปริมาตร 1 มิลลิลิตรแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ที่ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ทำการล้าง 2 ครั้ง หลังจากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วจึงนำมาชั่งน้ำหนัก

4. การวิเคราะห์ทางสถิติ

ข้อมูลที่ได้จากการทดลอง วิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าเฉลี่ย (Analysis of variance : ANOVA) โดยใช้ One way ANOVA เพื่อทดสอบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของชุดการทดลอง ซึ่งการวิเคราะห์ทางสถิติทั้งหมดจะใช้โปรแกรม SPSS for Window 22

บทที่ 4
ผลการวิจัย

1. การคัดแยกแบคทีเรียจากกระเพาะกระบือที่สามารถผลิตกรดซัคซินิคได้

1.1 การเก็บตัวอย่างและการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จากกระเพาะกระบือ

การเก็บตัวอย่างกระเพาะกระบือจากโรงฆ่าสัตว์ โดยตักของเหลวที่เจือปนอยู่กับเศษหญ้าหมักในบริเวณกระเพาะหมักหรือส่วนรูเมนของกระบือ (ภาพที่ 4-1) โดยสุ่มเก็บตัวอย่างทั้งหมด 5 บริเวณทั่วกระเพาะแล้วใส่ในขวดเก็บตัวอย่างที่มีอาหารสำหรับฟื้นฟูเชื้อ (Enrichment medium) แล้วรีบปิดฝา นำไปใส่ถุงพลาสติกมัดปากถุงอีกชั้นหนึ่งแล้วนำใส่กล่องพลาสติกแล้วปิดฝากล่องด้วยกระดาษกาวอีกครั้งหนึ่งเพื่อไม่ให้มีก๊าซออกซิเจนเข้าไปได้ แล้วจึงรีบนำกลับมายังห้องปฏิบัติการ เพื่อนำกล่องพลาสติกใสมาทำการเติมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำไปใส่ตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

ภาพที่ 4-1 กระเพาะอาหารส่วนรูเมนของกระบือที่เก็บตัวอย่าง

ภาพที่ 4-2 ขวดบรรจุตัวอย่างจากกระเพาะของกระบือ

1.2 การคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถเจริญในสภาวะไร้ออกซิเจน

จากการเก็บตัวอย่างของเหลวจากกระเพาะกระบือทั้งหมด 5 ขวดตัวอย่าง นำมาบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง และนำมาเจือจางที่อัตราการเจือจาง 10^{-3}, 10^{-4} และ 10^{-5} เท่า จากนั้นจึงเกลี่ย (Spread) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Screening agar ผลการทดลองพบว่าสามารถคัดแยกแบคทีเรียที่มีโคโลนีซึ่งแตกต่างกันที่สามารถเจริญในสภาวะไร้ออกซิเจนจำนวน 46 ไอโซเลต (ตารางที่ 4-1)

ตารางที่ 4-1 ผลการคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถเจริญและสามารถเปลี่ยนสีของอาหาร Screening agar จากสีเขียวเป็นสีเหลือง

ไอโซเลต (Isolate)	**อาหาร Screening agar (สามารถเปลี่ยนสีเป็นสีเหลืองส้ม)**	**อาหาร TSB (การขุ่นของอาหาร)**
1	X	✓
2	✓	✓
3	✓	✓
4	✓	✓
5	✓	✓
6	X	✓

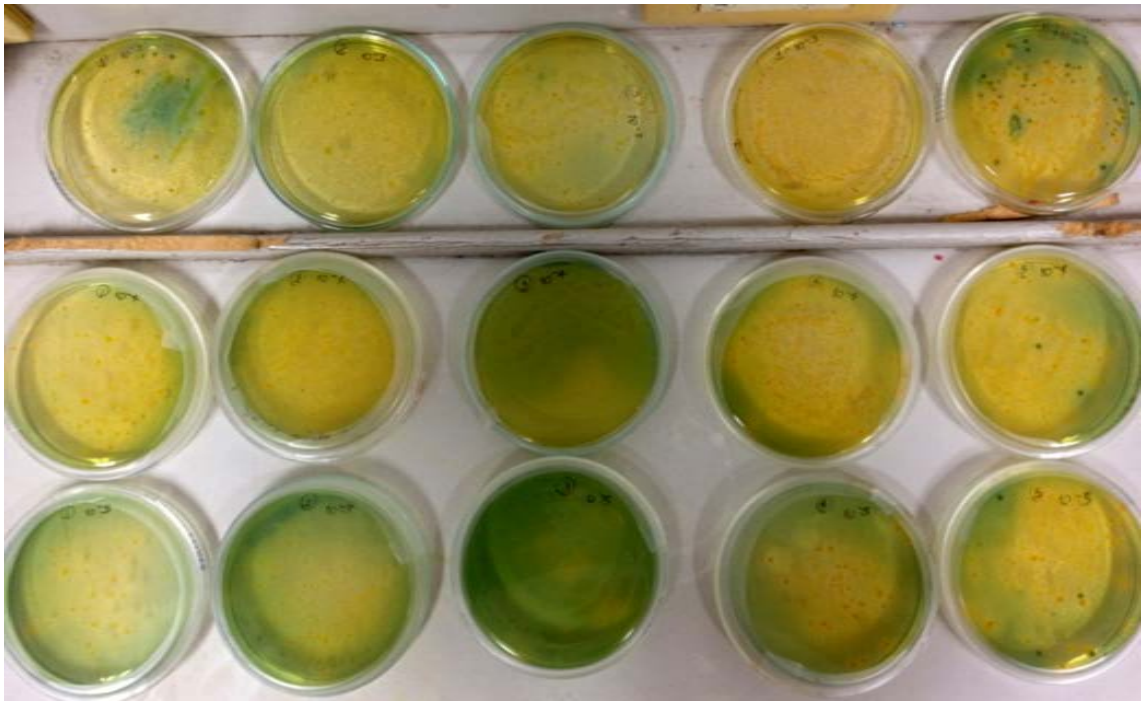
ตารางที่ 4-1 (ต่อ)

ไอโซเลต (Isolate)	อาหาร Screening agar (สามารถเปลี่ยนสีเป็นสีเหลืองส้ม)	อาหาร TSB (การขุ่นของอาหาร)
7	✓	✓
8	✓	✓
9	X	✓
10	X	✓
11	X	✓
12	✓	✓
13	✓	✓
14	✓	✓
15	X	✓
16	✓	✓
17	✓	✓
18	X	✓
19	✓	✓
20	X	✓
21	X	✓
22	X	✓
23	X	✓
24	X	✓
25	✓	✓
26	✓	✓
27	✓	✓
28	✓	✓
29	✓	✓
30	✓	✓

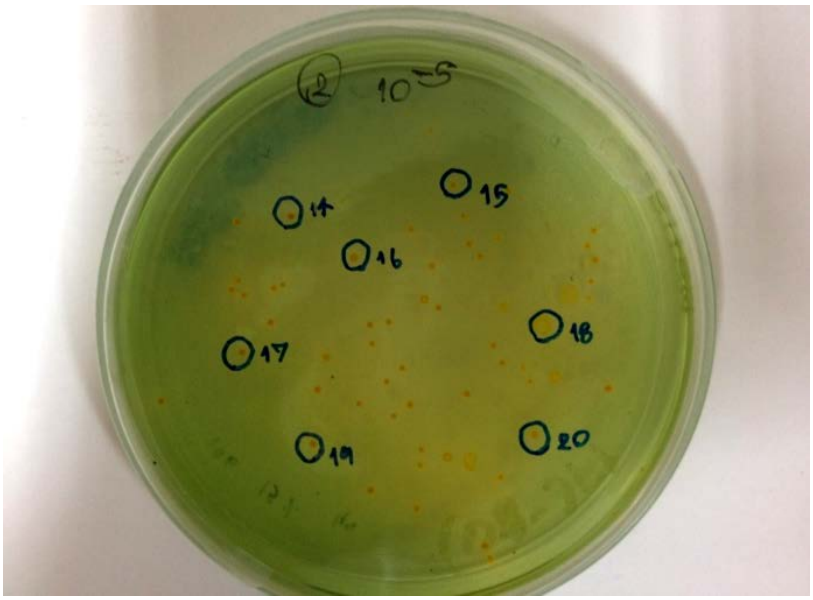
ตารางที่ 4-1 (ต่อ)

ไอโซเลต (Isolate)	อาหาร Screening agar (สามารถเปลี่ยนสีเป็นสีเหลืองส้ม)	อาหาร TSB (การขุ่นของอาหาร)
31	✓	✓
32	✓	✓
33	✓	✓
34	✓	✓
35	✓	✓
36	✓	✓
37	✓	✓
38	X	✓
39	✓	✓
40	✓	✓
41	✓	✓
42	X	✓
43	X	✓
44	✓	✓
45	✓	✓
46	✓	✓

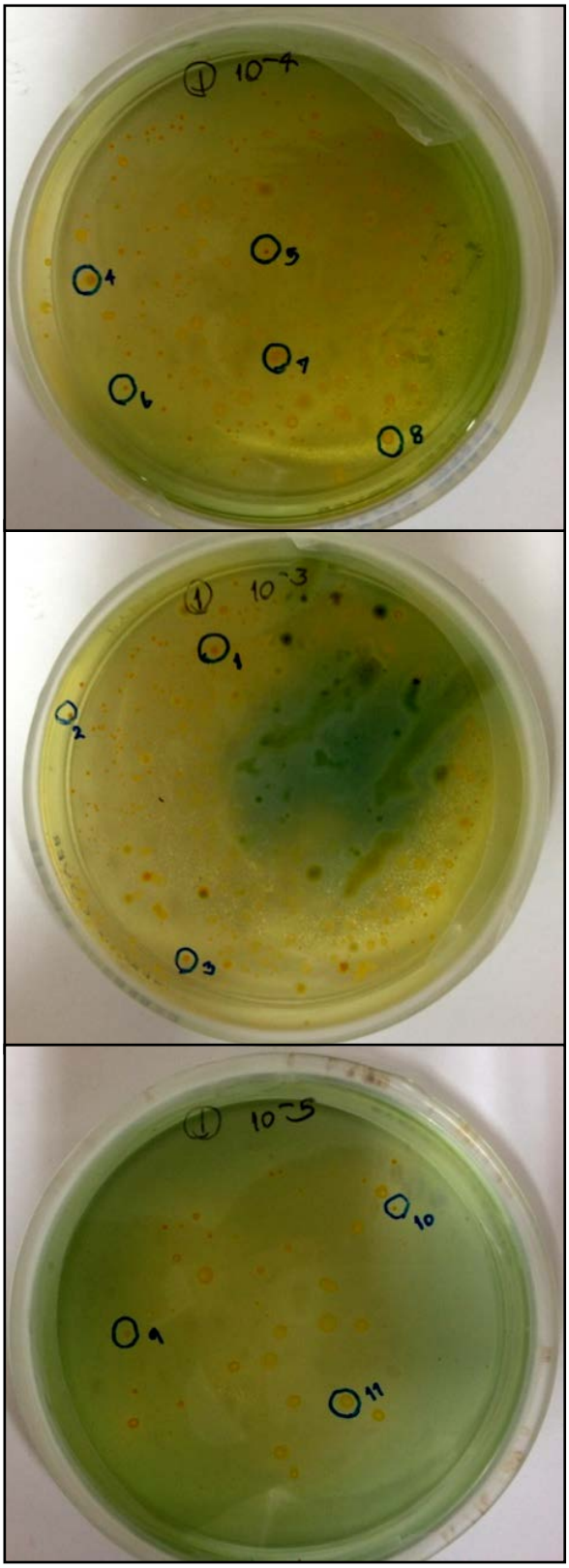
จากการทดลองการนำแบคทีเรียทั้งหมด 46 ไอโซเลตที่คัดแยกขั้นต้นได้จากกระเพาะกระบือมาทำการคัดเลือกโคโลนีบริสุทธิ์ สามารถเจริญ และเปลี่ยนสีของอาหาร Screening agar จากสีเขียวเป็นสีเหลืองซึ่งแสดงว่ามีการผลิตกรดอินทรีย์ ผลการทดลองพบว่า มีแบคทีเรียจำนวน 30 ไอโซเลตที่เป็นโคโลนีบริสุทธิ์ สามารถเจริญ และเปลี่ยนสีของอาหาร ซึ่งได้แก่ ไอโซเลต 2, 3, 4, 5, 7, 8, 12, 13, 14, 16, 17, 19, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 39, 40, 41, 44, 45 และ 46 และพบว่ามีไอโซเลต 1, 6, 9, 10, 11, 15, 18, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 38, 42 และ 43 ที่ไม่สามารถเปลี่ยนสีของอาหาร Screening agar จากสีเขียวเป็นสีเหลืองได้ ดังนั้นสามารถคัดเลือกแบคทีเรียจำนวน 30 ไอโซเลต (ภาพที่ 4-3 ถึง ภาพที่ 4-9) เพื่อนำไปทดสอบต่อไป



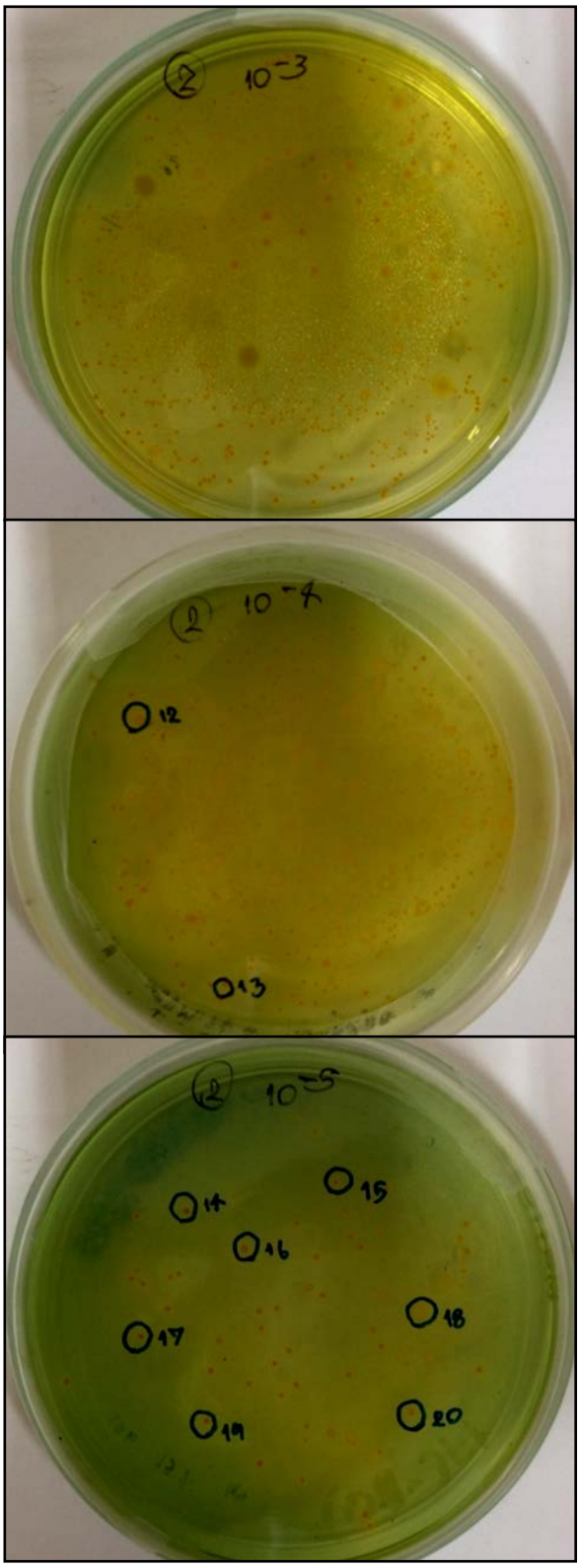
ภาพที่ 4-3 จานเพาะเชื้อที่มีแบคทีเรียเจริญอยู่บนอาหาร Screening agar



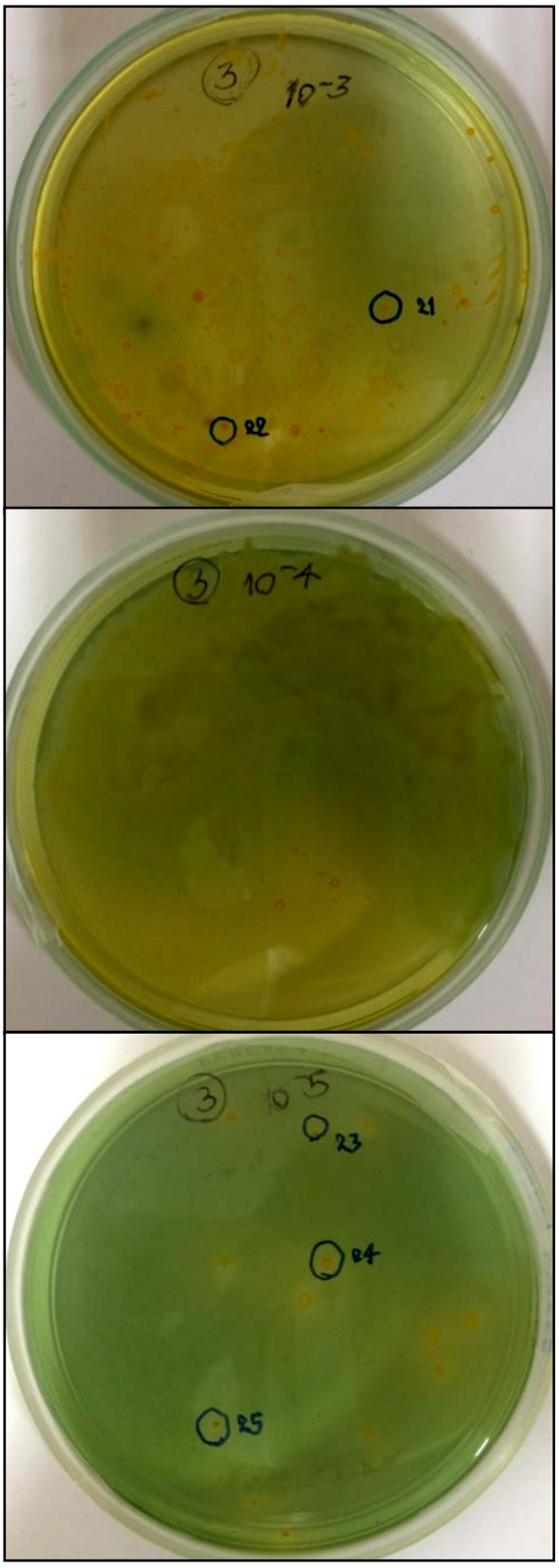
ภาพที่ 4-4 โคโลนีแบคทีเรียที่สามารถเจริญและเปลี่ยนสีอาหาร Screening agar เป็นสีเหลืองได้



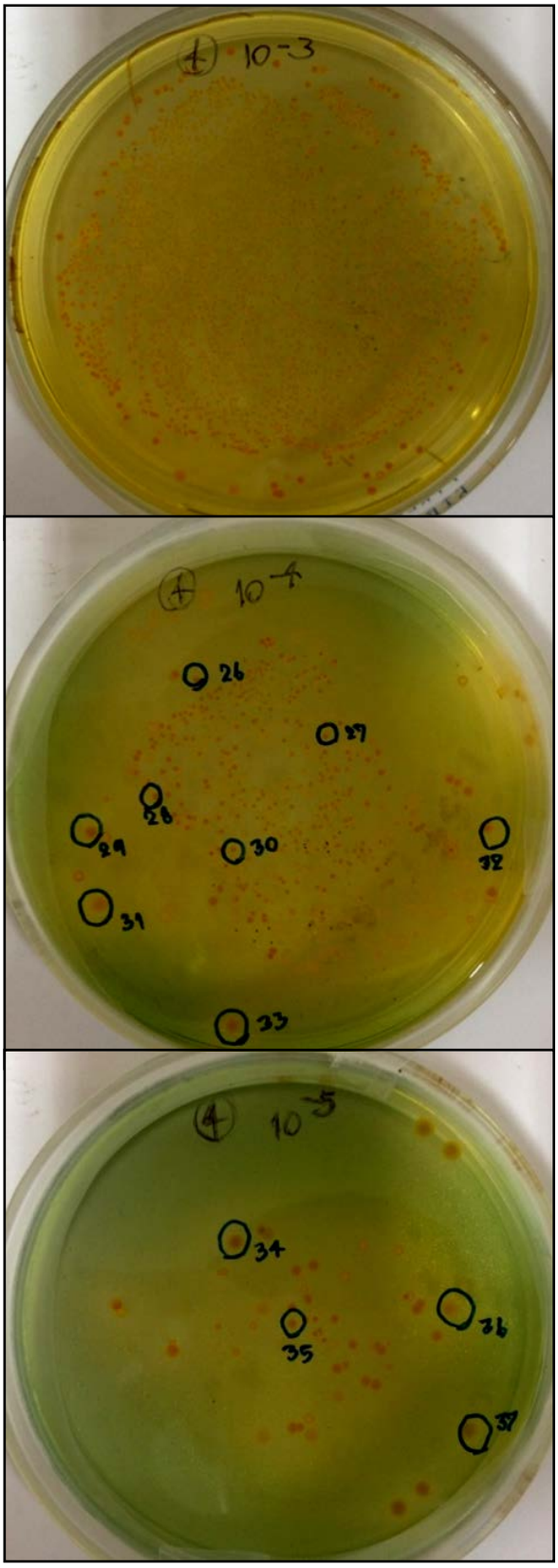
ภาพที่ 4-5 โคโลนีแบคทีเรียของขวดเก็บตัวอย่างที่ 1 อัตราการเจือจาง 10^{-3}, 10^{-4} และ 10^{-5} ที่คัดเลือก



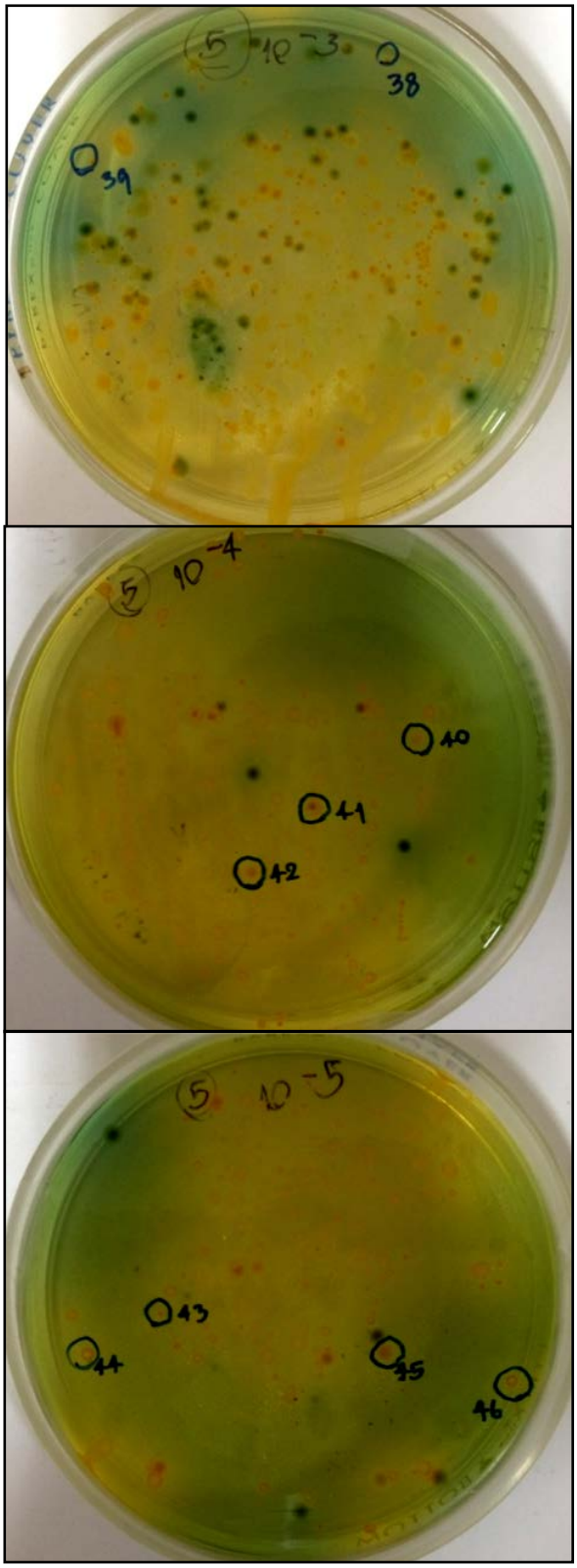
ภาพที่ 4-6 โคโลนีแบคทีเรียของขวดเก็บตัวอย่างที่ 2 อัตราการเจือจาง 10^{-3}, 10^{-4} และ 10^{-5} ที่คัดเลือก



ภาพที่ 4-7 โคโลนีแบคทีเรียของขวดเก็บตัวอย่างที่ 3 อัตราการเจือจาง 10^{-3}, 10^{-4} และ 10^{-5} ที่คัดเลือก



ภาพที่ 4-8 โคโลนีแบคทีเรียของขวดเก็บตัวอย่างที่ 4 อัตราการเจือจาง 10^{-3}, 10^{-4} และ 10^{-5} ที่คัดเลือก



ภาพที่ 4-9 โคโลนีแบคทีเรียของขวดเก็บตัวอย่างที่ 5 อัตราการเจือจาง 10^{-3}, 10^{-4} และ 10^{-5} ที่คัดเลือก

1.3 การทดสอบการผลิตกรดซัคซินิคของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ในขวดทดลองขนาด 50 มิลลิลิตร

จากผลการทดสอบการผลิตกรดซัคซินิคของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ในขวด ทดลองขนาด 50 มิลลิลิตรทั้งหมด 30 ไอโซเลต พบว่ามีแบคทีเรียจำนวน 6 ไอโซเลตที่สามารถผลิตกรดซัคซินิคได้ในปริมาณที่สูง ซึ่งได้แก่ ไอโซเลตที่ 12, 28, 34, 35, 36 และ 37 ซึ่งได้ตัดไอโซเลตที่ 34 และ 36 ออก เนื่องจากสันนิษฐานว่าเป็นเชื้อตัวเดียวกับไอโซเลต ที่ 35 และ 37 โดยสังเกตจากลักษณะรูปร่างของโคโลนี ทำให้ได้แบคทีเรียจำนวน 4 ไอโซเลตคือ 12, 28, 35 และ 37 (ตารางที่ 4-2) เพื่อนำไปทดสอบการผลิตกรดซัคซินิคในขวดรูปชมพู่ต่อไป

ตารางที่ 4-2 ผลการทดสอบการผลิตกรดซัคซินิคในขวดทดลองขนาด 50 มิลลิลิตร

Isolate	การขุ่น	ครั้งที่ 1 (g/l)			ครั้งที่ 2 (g/l)			ค่าเฉลี่ย (g/l)		
		SA	LA	AC	SA	LA	AC	SA	LA	AC
2	✓	0.12	11.677	-	-	11.673	-	0.12	11.675	-
3	✓	0.937	9.772	-	1.028	9.878	-	0.982	9.825	-
4	✓	0.846	6.364	-	0.874	7.908	-	0.86	7.136	-
5	✓	0.151	7.226	-	-	7.449	-	0.151	7.337	-
7	✓	0.438	7.721	0.959	0.352	7.717	0.988	0.395	7.719	0.973
8	✓	-	8.493	-	-	7.01	-	-	7.751	-
12	✓	1.421	6.321	1.271	1.373	6.132	1.16	1.397	6.226	1.215
13	✓	-	11.233	-	-	10.401	-	-	10.817	-
14	✓	-	11.28	-	-	10.919	-	-	11.099	-
16	✓	-	8.975	-	-	8.556	-	-	8.765	-
17	✓	-	10.161	-	-	11.275	-	-	10.718	-
19	✓	-	11.274	-	-	11.499	-	-	11.386	-
26	✓	0.846	14.71	1.173	1.068	7.891	1.371	0.957	11.300	1.272
27	✓	1.141	13.408	1.607	1.229	9.15	1.549	1.185	11.279	1.578
28	✓	1.316	8.765	1.428	1.329	6.908	1.566	1.322	7.836	1.497
29	✓	1.221	6.246	1.52	0.819	11.551	1.094	1.02	7.0	1.219
30	✓	0.771	10.398	1.009	0.849	11.551	1.094	0.81	10.974	1.051

ตารางที่ 4-2 (ต่อ)

Isolate	การขุ่น	ครั้งที่ 1 (g/l)			ครั้งที่ 2 (g/l)			ค่าเฉลี่ย (g/l)		
		SA	LA	AC	SA	LA	AC	SA	LA	AC
31	✓	1.266	6.676	1.483	1.292	6.01	1.471	1.279	6.343	1.477
32	✓	1.249	6.538	1.474	1.216	9.639	1.634	1.232	8.088	1.554
33	✓	1.204	9.567	1.537	1.278	8.305	1.482	1.241	8.936	1.509
34	✓	1.314	8.44	1.608	1.344	7.094	1.649	1.329	7.767	1.628
35	✓	1.377	6.578	1.622	1.293	6.005	1.575	1.335	6.291	1.598
36	✓	1.309	6.309	1.545	1.351	6.51	1.644	1.33	6.419	1.594
37	✓	1.344	6.282	1.674	1.39	6.435	1.661	1.367	6.358	1.667
39	✓	-	10.816	-	-	10.826	-	-	10.821	-
40	✓	1.195	7.091	1.645	1.264	6.775	1.505	1.229	6.933	1.575
41	✓	-	8.113	-	-	7.857	-	-	7.985	-
44	✓	-	6.729	-	-	5.342	-	-	6.035	-
45	✓	0.827	12.662	1.053	0.897	10.128	1.141	0.862	11.395	1.097
46	✓	-	7.737	-	-	6.874	-	-	7.305	-

“หมายเหตุ” SA = Succinic acid, LA = Lactic acid, AC = Acetic acid

จากผลการวิเคราะห์กรดอินทรีย์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงด้วยเครื่อง HPLC พบว่า แบคทีเรียส่วนใหญ่สามารถผลิตกรดแลคติกได้ในปริมาณสูง ซึ่งมีสาเหตุมาจากแบคทีเรียที่คัดแยกได้นั้นมาจากธรรมชาติจึงสามารถผลิตกรดอินทรีย์ในหลายชนิด และในการผลิตกรดซัคซินิคจำเป็นต้องมีคาร์บอนไดออกไซด์ในปริมาณที่สูง จึงจะทำให้แบคทีเรียผลิตกรดซัคซินิคในปริมาณที่สูง เช่นเดียวกัน ถ้ามีคาร์บอนไดออกไซด์ที่ต่ำ จะส่งผลให้แบคทีเรียผลิตกรดอื่น ๆ แทน เช่น กรดแลคติก กรดอะซิติก เป็นต้น เนื่องจากการทดลองทำในขวดทดลอง ซึ่งไม่ได้มีการเติมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ไปโดยตรง จึงเป็นสาเหตุให้แบคทีเรียผลิตกรดซัคซินิคได้ในระดับต่ำ

1.4 การทดสอบการผลิตกรดซัคซินิคของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร

จากผลการทดสอบการผลิตกรดซัคซินิคของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร โดยมีอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 100 มิลลิลิตร พบว่า จากผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดซัคซินิคที่แบคทีเรียสามารถผลิตได้ทั้งหมด 4 ไอโซเลตนั้น คือไอโซเลตที่ 12, 28, 35 และ 37 สามารถผลิตกรดซัคซินิคได้ 1.238, 1.448, 1.909 และ 2.883 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยไอโซเลตที่ 37 สามารถผลิตกรดซัคซินิคได้สูงที่สุดคือ 2.883 กรัมต่อลิตร และสามารถผลิตกรดซัคซินิคได้สูงกว่าเชื้อหมายเลข 19 ที่เป็นเชื้อตัวเก่า (1.76 กรัมต่อลิตร) แต่ผลิตกรดซัคซินิคได้ต่ำกว่าเชื้อมาตรฐาน (*Actinobacillus succinogenes* ATCC55618) (5.601 กรัมต่อลิตร) ดังนั้นจึงเลือกใช้แบคทีเรียหมายเลข 37 เป็นแบคทีเรียในการทดลองต่อไป

2. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดซัคซินิคของแบคทีเรียที่คัดแยกได้

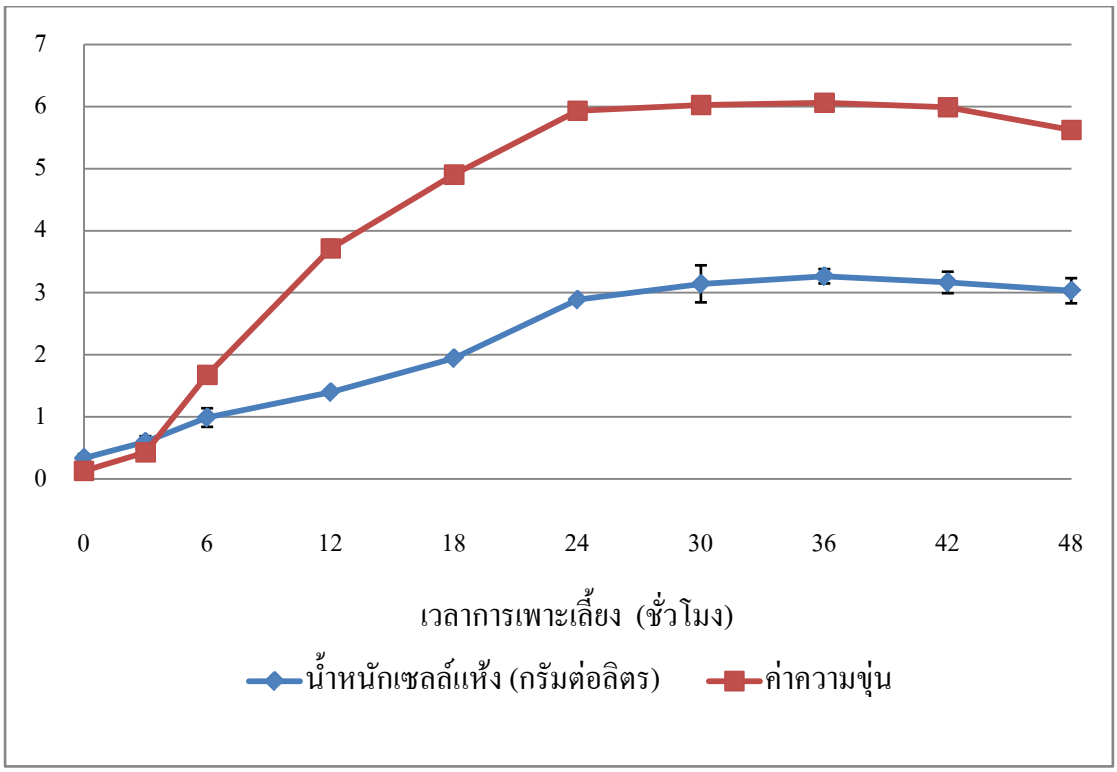
2.1 การศึกษาอัตราการเจริญของของแบคทีเรียหมายเลข 37

จากการศึกษาอัตราการเจริญของแบคทีเรียหมายเลข 37 ที่คัดแยกได้จากกระเพาะกระบือ ซึ่งสามารถผลิตกรดซัคซินิคได้ในปริมาณที่สูง จึงนำมาใช้ในการผลิตกรดซัคซินิคโดยทำการทดลองในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Production medium 1 ที่สภาวะอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 6.5 เพาะเลี้ยงในเครื่องบ่มแบบเขย่า โดยเขย่าที่ 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ซึ่งผลการทดลองพบว่าแบคทีเรียสามารถเจริญได้ดีและเจริญได้รวดเร็วในช่วงเวลา 0-24 ชั่วโมง และมีแนวโน้มคงที่หลังจากชั่วโมงที่ 24 (ภาพที่ 4-10) และพบว่าปริมาณน้ำตาลคงเหลือถูกใช้หมดที่เวลา 48 ชั่วโมง (ภาพที่ 4-11) สังเกตเห็นว่ากรดซัคซินิคมีความเข้มข้นสูงขึ้นอย่างต่อเนื่องตามระยะเวลาการหมักจนกระทั่งถึงชั่วโมงที่ 24 ซึ่งสามารถผลิตกรดซัคซินิคได้ 6.74 กรัมต่อลิตร หลังจากนั้นความเข้มข้นของกรดซัคซินิคมีแนวโน้มคงที่ไปจนถึงสิ้นสุดกระบวนการหมักที่ 48 ชั่วโมง เมื่อนำมาวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติแล้วพบว่าความเข้มข้นของกรดซัคซินิคตั้งแต่เวลา 24 ชั่วโมง จนถึงที่ 48 ชั่วโมง ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<.05$) (ภาคผนวก ค) ในขณะที่กรดอะซิติกและกรดแลกติกมีปริมาณเพิ่มสูงขึ้นตามระยะเวลาการหมัก แต่หลังจากชั่วโมงที่ 24 พบว่ามีปริมาณเพิ่มสูงขึ้นอย่างมากจนถึงชั่วโมงที่ 48 (ภาพที่ 4-12)

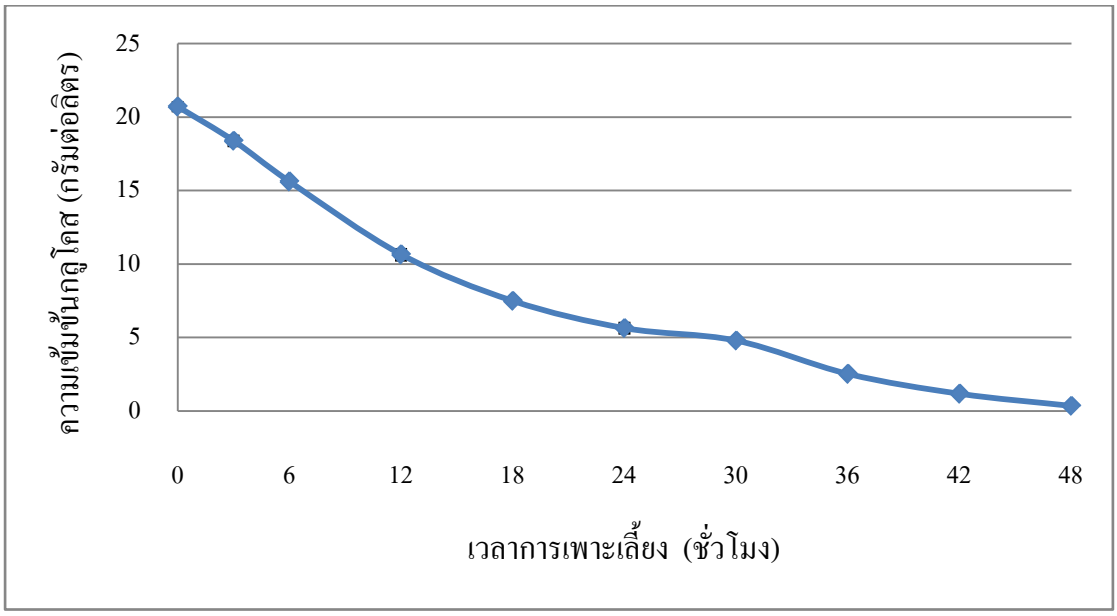
ตารางที่ 4-3 ผลิตภัณฑ์กรดอินทรีย์ที่ได้จากการทดสอบในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร

Isolate	ครั้งที่	Succinic acid	Lactic acid	Acetic acid
12	1[N]	0.454	-	8.015
	2	1.306	10.151	2.57
	3	1.17	9.897	2.422
เฉลี่ย		**1.238**	**10.024**	**2.496**
28	1	1.512	3.114	3.774
	2[N]	0.763	1.684	5.076
	3	1.384	3.513	3.751
เฉลี่ย		**1.448**	**3.3135**	**3.7625**
35	1	1.916	6.778	4.009
	2	1.902	6.469	3.861
	3[N]	1.405	6.816	3.778
เฉลี่ย		**1.909**	**6.623**	**3.935**
37	1	2.947	6.732	4.008
	2	2.809	6.797	3.900
	3	2.893	7.566	3.905
เฉลี่ย		**2.883**	**7.031**	**3.937**
Isolate	**ครั้งที่**	**Succinic acid**	**Lactic acid**	**Acetic acid**
เชื้อ 19 (ประภัสสร และ อิทธิพล, 2553)	1	1.776	5.221	3.325
	2	1.689	5.342	3.146
	3	1.815	5.401	3.318
เฉลี่ย		**1.76**	**5.321**	**3.263**
เชื้อมาตรฐาน (*A. succinogenes* ATCC 55618)	1	5.34	1.063	2.139
	2	5.84	0.762	2.055
	3	5.625	1.012	2.994
เฉลี่ย		**5.601**	**0.945**	**2.396**

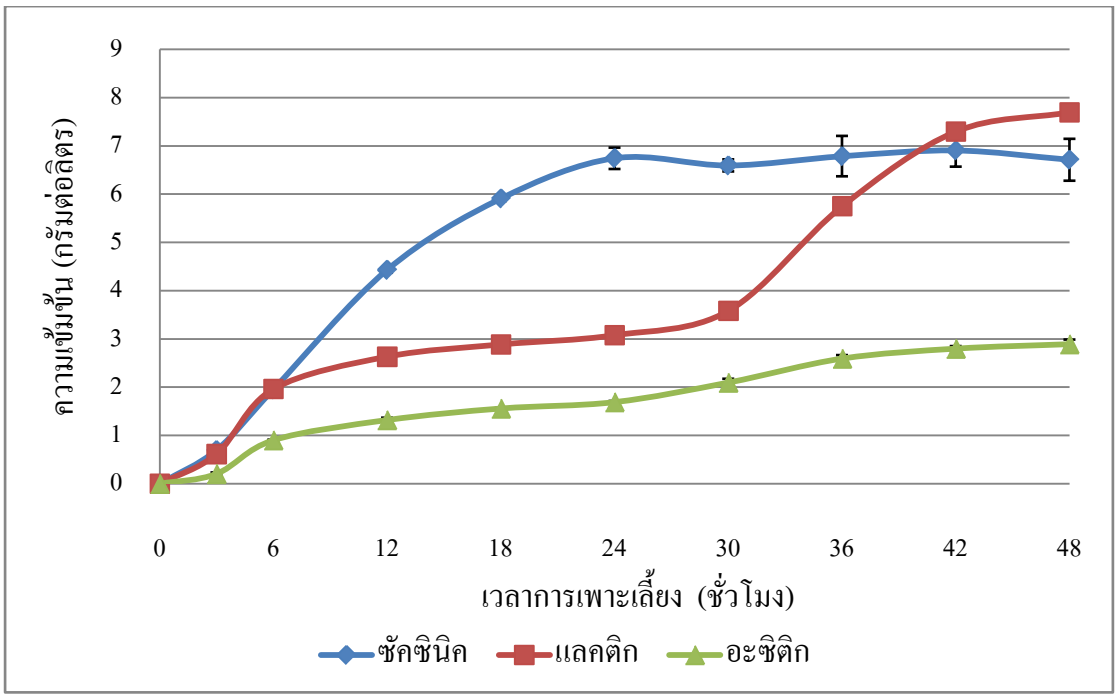
“หมายเหตุ” N คือ ค่าที่แตกต่างเกินไป ซึ่งไม่ได้นำมาคิดเป็นค่าเฉลี่ย



ภาพที่ 4-10 น้ำหนักเซลล์แห้งและค่าความขุ่น ของการผลิตกรดซัคซินิคในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร ด้วยแบคทีเรียหมายเลข 37



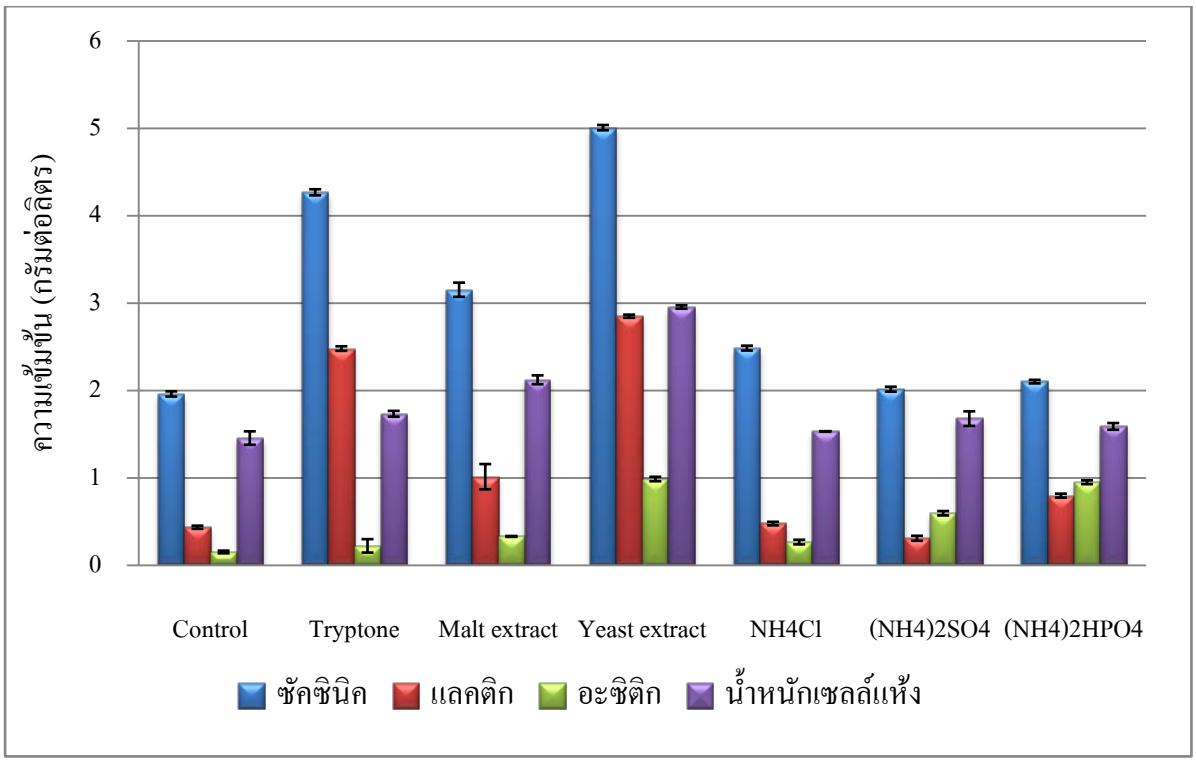
ภาพที่ 4-11 ปริมาณการใช้น้ำตาลกลูโคสในการหมักเพื่อผลิตกรดซัคซินิคในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร ด้วยแบคทีเรียหมายเลข 37



ภาพที่ 4-12 ผลิตภัณฑ์กรดอินทรีย์จากผลิตกรดซัคซินิคในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร ด้วยแบคทีเรียหมายเลข 37

2.2 การศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตกรดซัคซินิคของแบคทีเรียหมายเลข 37

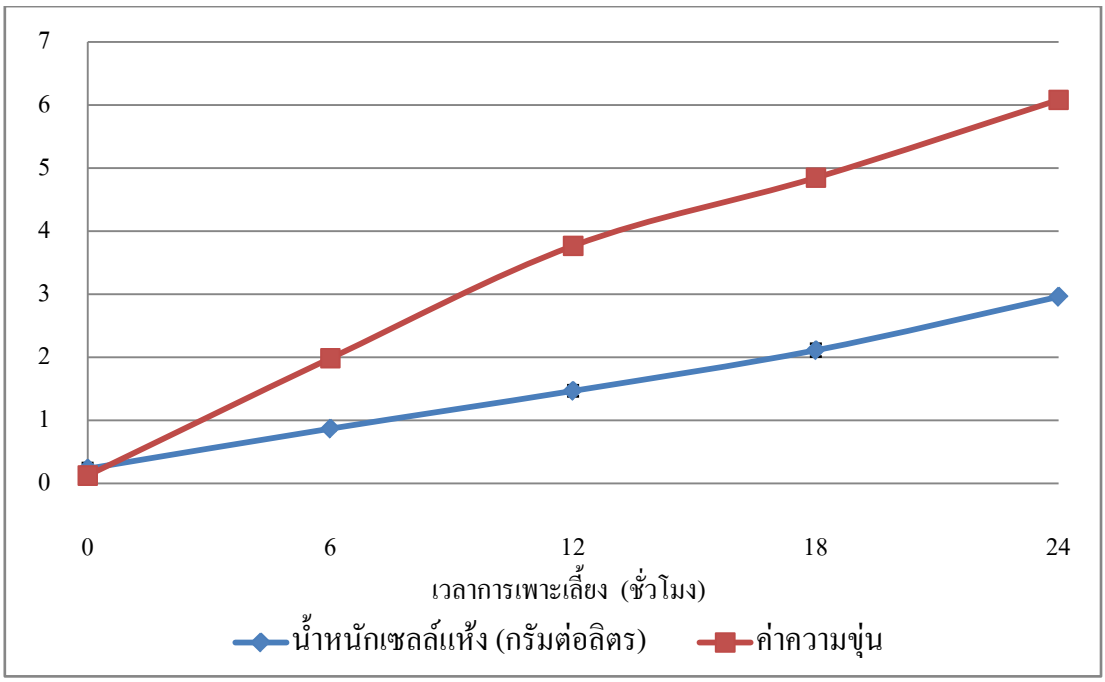
จากการศึกษาการหาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับกระบวนการหมักเพื่อผลิตกรดซัคซินิคโดยใช้แหล่งไนโตรเจนในองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่แตกต่างกันทั้งหมด 6 ชนิดคือ ทริปโตน มอต์ลแอคแทร็ก ยีสต์แอคแทร็ก แอมโมเนียมคลอไรค์ แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมฟอสเฟต และมีชุดควบคุมซึ่งไม่ได้ใส่แหล่งไนโตรเจนใดเลย ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อพิจารณาจากภาพที่ 4-13 แสดงให้เห็นว่า การใช้ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนในกระบวนการหมักสามารถผลิตกรดซัคซินิคได้สูงที่สุดคือ 5.01 กรัมต่อลิตร ปริมาณกรดแลกติกและกรดอะซิติกเท่ากับ 2.85 และ 0.99 กรัมต่อลิตรตามลำดับ และแหล่งไนโตรเจนที่สามารถผลิตกรดซัคซินิคได้ในลำดับรองลงมาคือ ทริปโตน มอต์ลสกัด แอมโมเนียมคลอไรค์ แอมโมเนียมฟอสเฟต แอมโมเนียมซัลเฟต และชุดควบคุม ตามลำดับ (ภาพที่ 4-13)



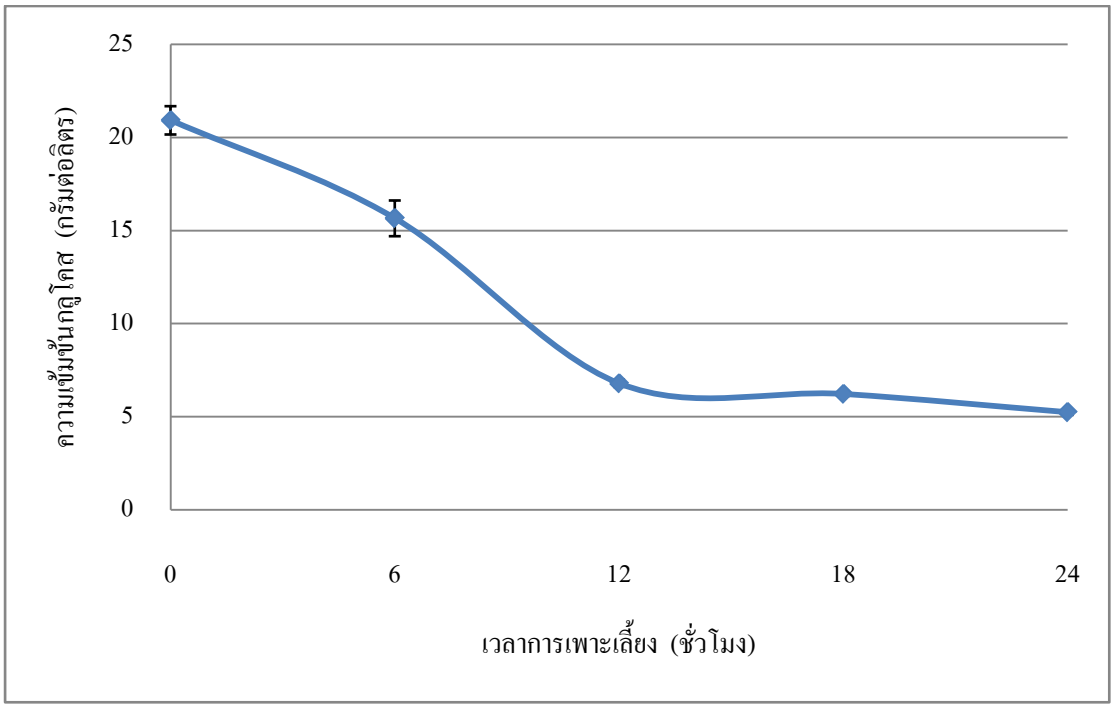
ภาพที่ 4-13 ผลิตภัณฑ์กรดอินทรีย์จากกระบวนการหมักด้วยแบคทีเรียหมายเลข 37 ที่ใช้แหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน

2.3 การเปรียบเทียบการผลิตกรดซัคซินิคของแบคทีเรียหมายเลข 37 และเชื้อมาตรฐาน

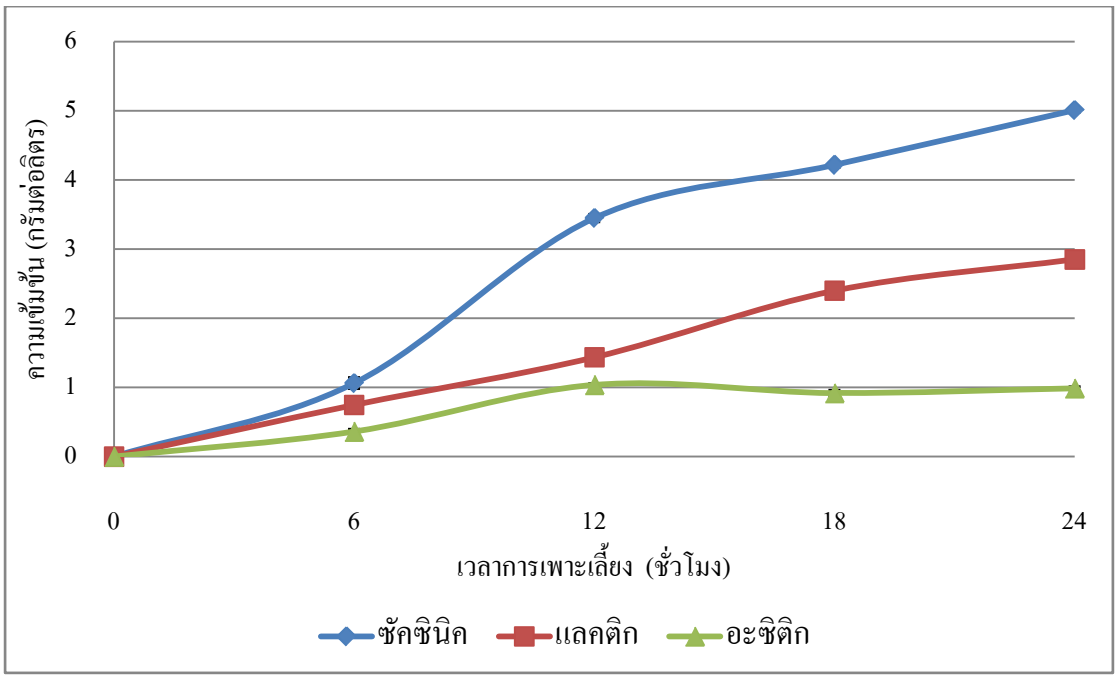
จากการศึกษาการผลิตกรดซัคซินิคโดยใช้อาหารสูตร Production medium 1 ที่มีแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมจากการทดลองที่ 2.2 โดยทำการเพาะเลี้ยงเปรียบเทียบระหว่างการใช้แบคทีเรียหมายเลข 37 และเชื้อมาตรฐาน (*A. succinogenes* ATCC 55618) ในการผลิตกรดซัคซินิค พบว่าการเพาะเลี้ยงด้วยแบคทีเรียหมายเลข 37 สามารถผลิตกรดซัคซินิคได้สูงที่สุดที่เวลา 24 ชั่วโมงคือ 5.01 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 4-16) แบคทีเรียสามารถเจริญได้สูงขึ้นเรื่อยๆ จนถึงชั่วโมงที่ 24 มีค่าความขุ่นเท่ากับ 6.08 และมีน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 2.96 กรัมต่อลิตร (ภาพ 4-14) และเมื่อพิจารณาจากปริมาณน้ำตาลคงเหลือ (ภาพที่ 4-15) พบว่าแบคทีเรียสามารถใช้น้ำตาลได้ดีจนกระทั่งหลังจากชั่วโมงที่ 12 จะมีแนวโน้มคงที่ และที่เวลา 24 ชั่วโมงมีปริมาณน้ำตาลคงเหลือเท่ากับ 5.23 กรัมต่อลิตร



ภาพที่ 4-14 น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) และค่าความขุ่นในกระบวนการหมักด้วยแบคทีเรียหมายเลข 37

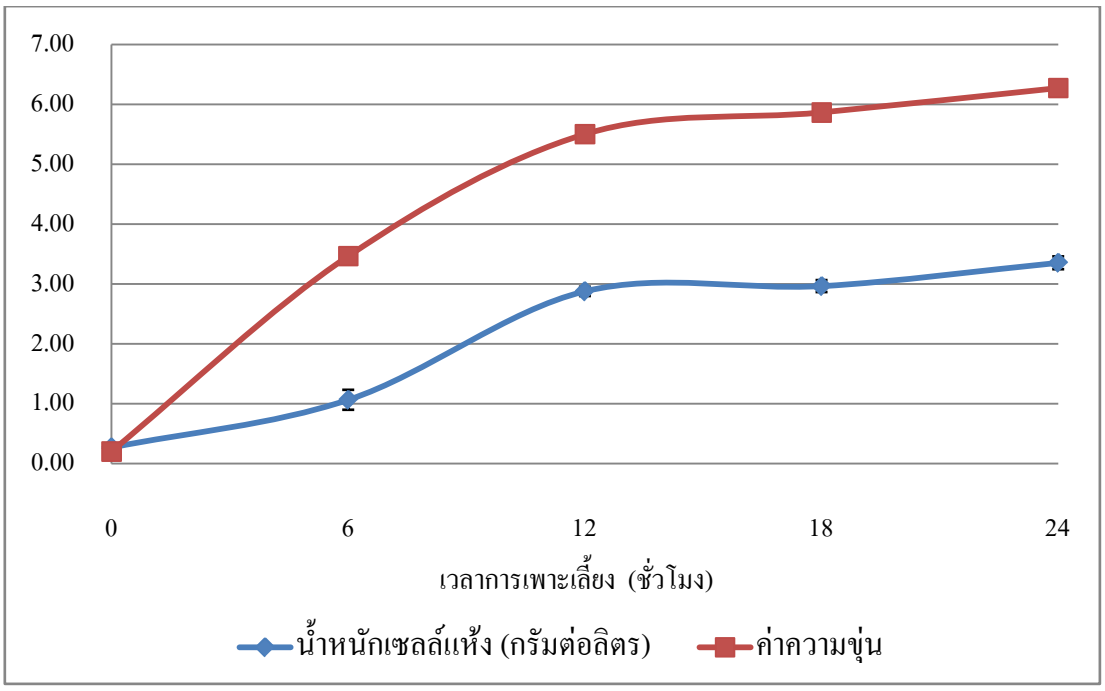


ภาพที่ 4-15 ปริมาณการใช้น้ำตาลกลูโคสในการหมักด้วยแบคทีเรียหมายเลข 37

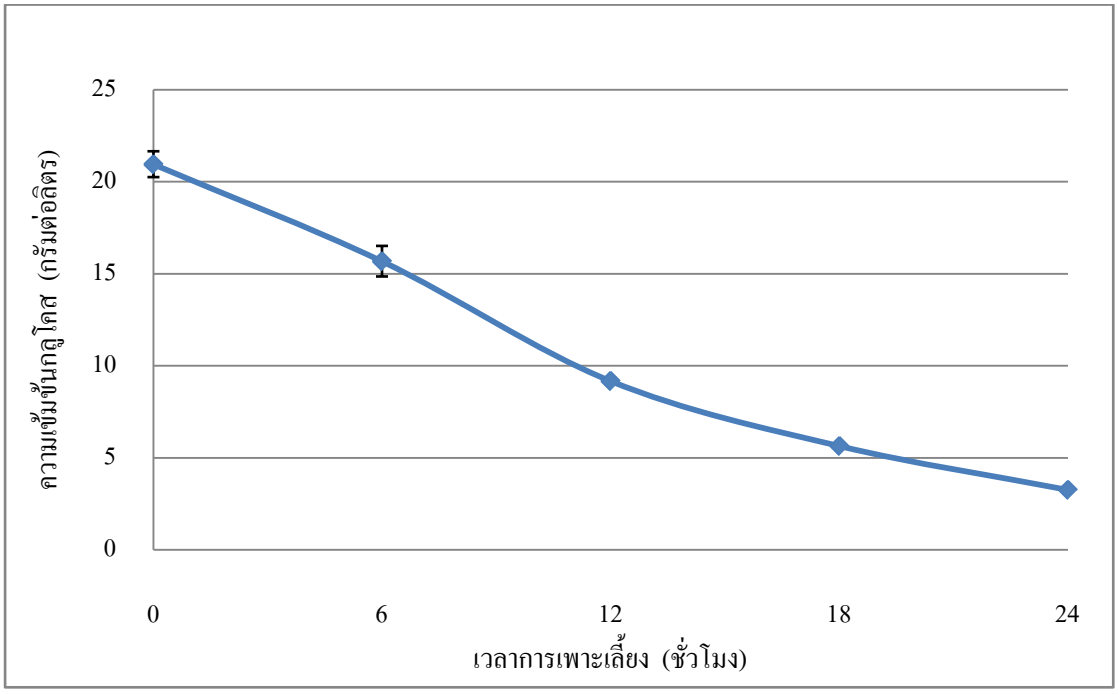


ภาพที่ 4-16 ผลิตภัณฑ์กรดอินทรีย์จากกระบวนการหมักด้วยแบคทีเรียหมายเลข 37

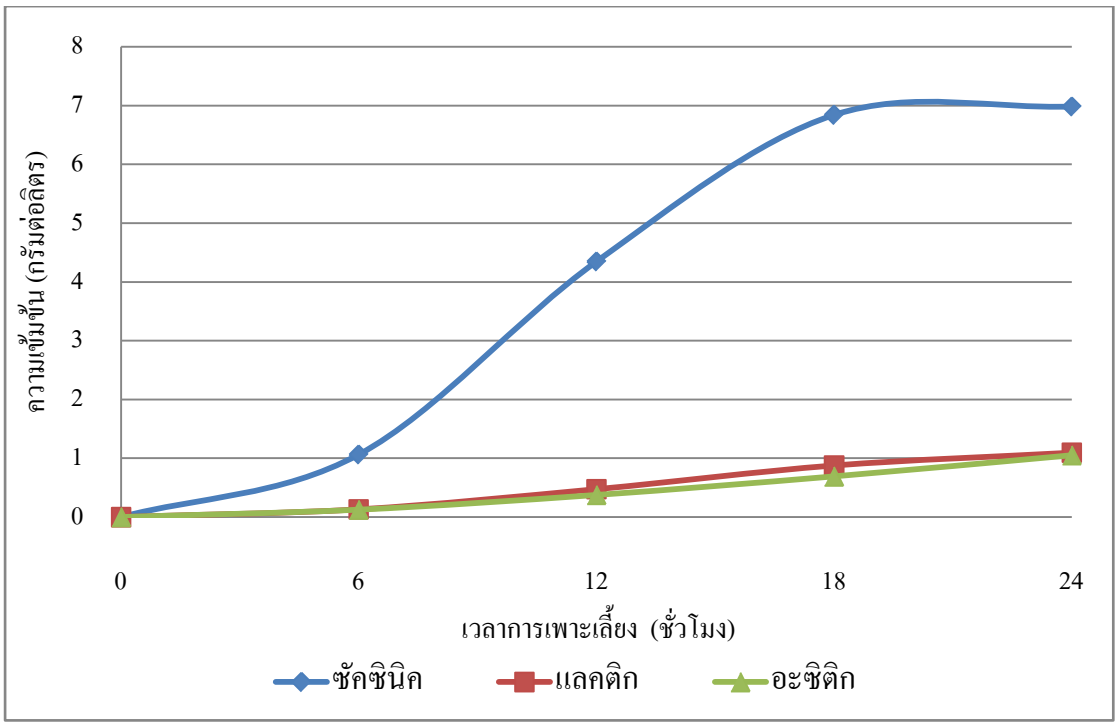
จากการศึกษาการผลิตกรดซัคซินิคด้วยเชื้อมาตรฐานพบว่า แบคทีเรียสามารถเจริญดีขึ้นเรื่อย ๆ จนถึงเวลา 24 ชั่วโมง ดังภาพที่ 4-17 โดยมีค่าความขุ่นเท่ากับ 6.27 และมีน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 3.36 กรัมต่อลิตร ปริมาณน้ำตาลคงเหลือที่เวลา 24 ชั่วโมงมีค่าเท่ากับ 3.26 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 4-18) และสามารถผลิตกรดซัคซินิคได้สูงสุดที่เวลา 24 ชั่วโมง (ภาพที่ 4-19) ซึ่งมีค่าเท่ากับ 6.98 กรัมต่อลิตร และสามารถผลิตกรดแลกติกและกรดอะซิติกได้เท่ากับ 1.09 และ 1.05 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ



ภาพที่ 4-17 น้ำหนักเซลล์แห้งและค่าความขุ่นในกระบวนการหมักด้วย *A.succinogenes* ATCC 55618

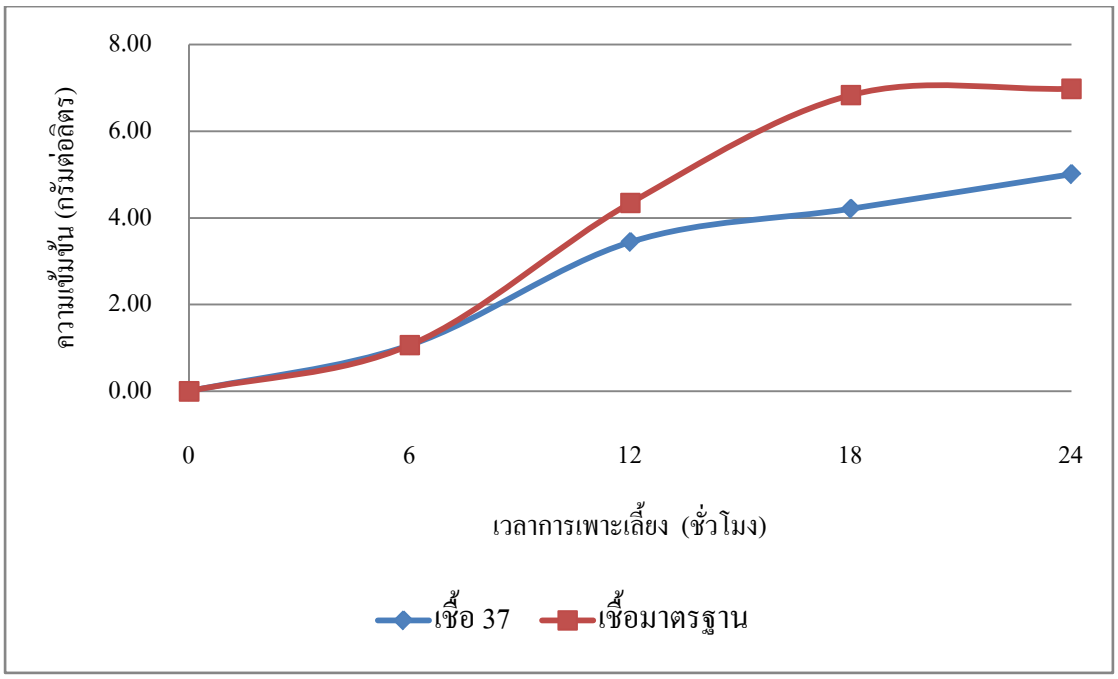


ภาพที่ 4-18 ปริมาณการใช้น้ำตาลกลูโคสในการหมักด้วย *A.succinogenes* ATCC55618



ภาพที่ 4-19 ผลิตภัณฑ์กรดอินทรีย์จากกระบวนการหมักด้วย *A.succinogenes* ATCC55618

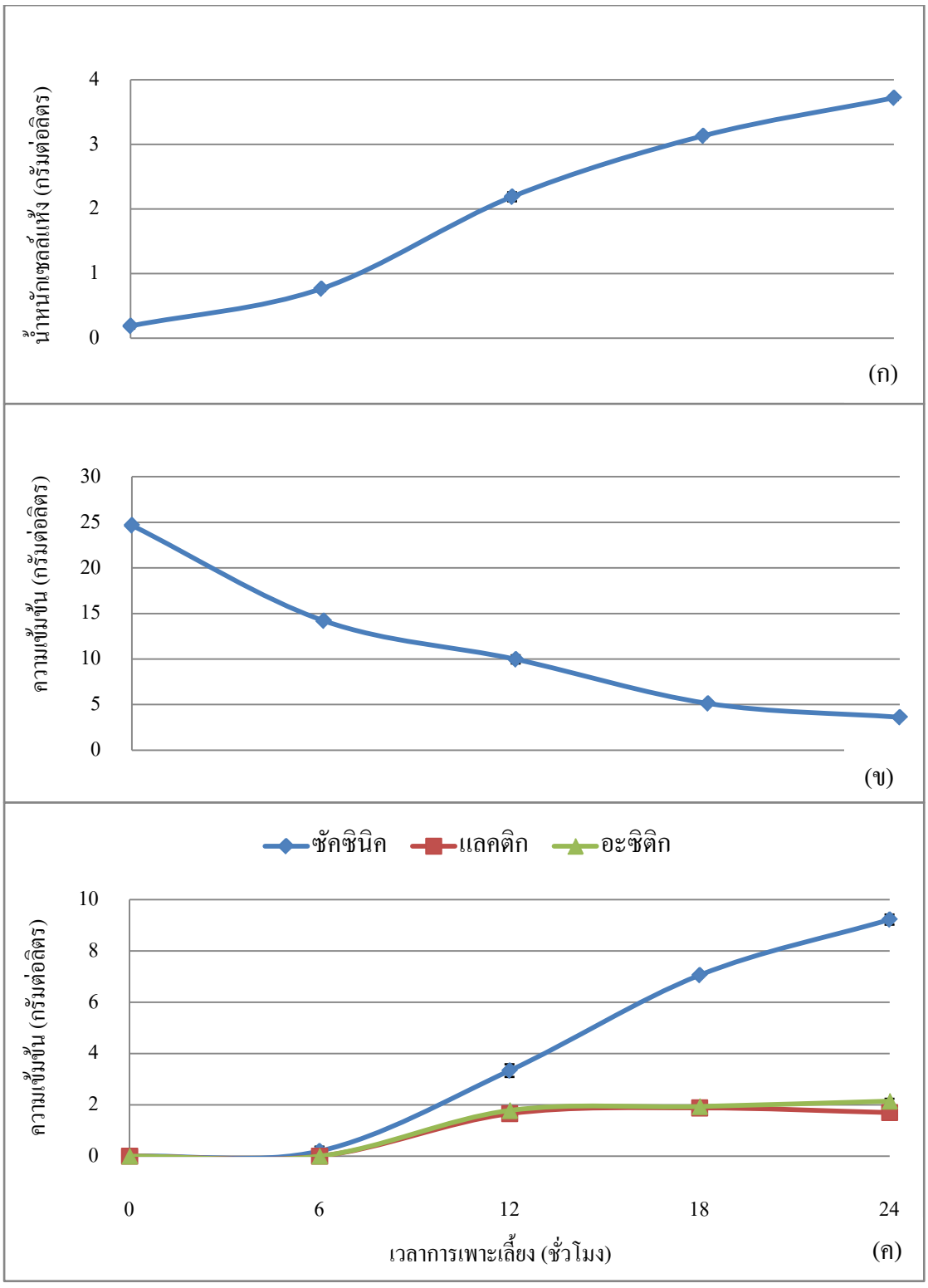
เมื่อเปรียบเทียบผลการทดลองการผลิตกรดซัคซินิคด้วยแบคทีเรียหมายเลข 37 และเชื้อมาตรฐานพบว่า การผลิตกรดซัคซินิคโดยใช้เชื้อมาตรฐานสามารถผลิตกรดซัคซินิคได้ปริมาณสูงกว่าการใช้แบคทีเรียหมายเลข 37 โดยที่เวลา 24 ชั่วโมงนั้นเชื้อมาตรฐานสามารถผลิตกรดซัคซินิคได้เท่ากับ 6.98 กรัมต่อลิตร ในขณะที่แบคทีเรียหมายเลข 37 สามารถผลิตได้ 5.01 กรัมต่อลิตร



ภาพที่ 4-20 เปรียบเทียบกรดซัคซินิคที่ได้จากกระบวนการหมักด้วยเชื้อ 37 กับเชื้อ *A.succinogenes* ATCC55618

2.4 การศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดซัคซินิคของแบคทีเรียหมายเลข 37

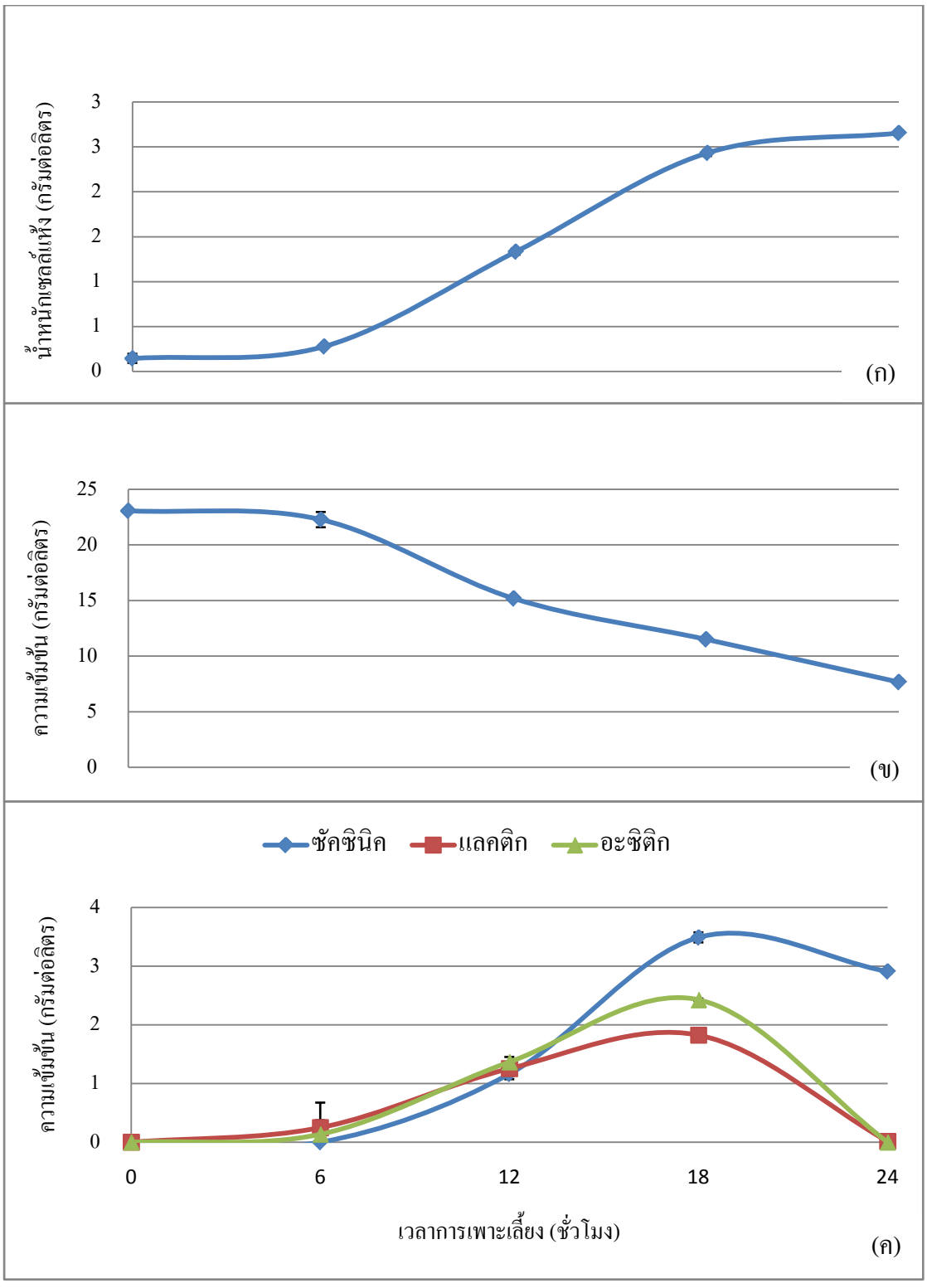
จากการศึกษาการผลิตกรดซัคซินิคโดยใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกันคือ น้ำตาลกลูโคสทางการค้า กลีเซอรอล และน้ำตาลกลูโคสจากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง ซึ่งผลการทดลองพบว่าจากภาพที่ 4-21 การใช้กลูโคสทางการค้าเป็นแหล่งคาร์บอนในกระบวนการหมัก แบคทีเรียสามารถเจริญได้ดีโดยเจริญขึ้นเรื่อย ๆ จนถึงเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งมีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 3.72 กรัมต่อลิตร และมีปริมาณน้ำตาลคงเหลือเท่ากับ 3.62 กรัมต่อลิตร ในขณะที่สามารถผลิตกรดซัคซินิคได้สูงที่สุดที่เวลา 24 ชั่วโมง เท่ากับ 9.22 กรัมต่อลิตร ได้กรดแลกติกและกรดอะซิติกเท่ากับ 1.70 และ 2.14 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ



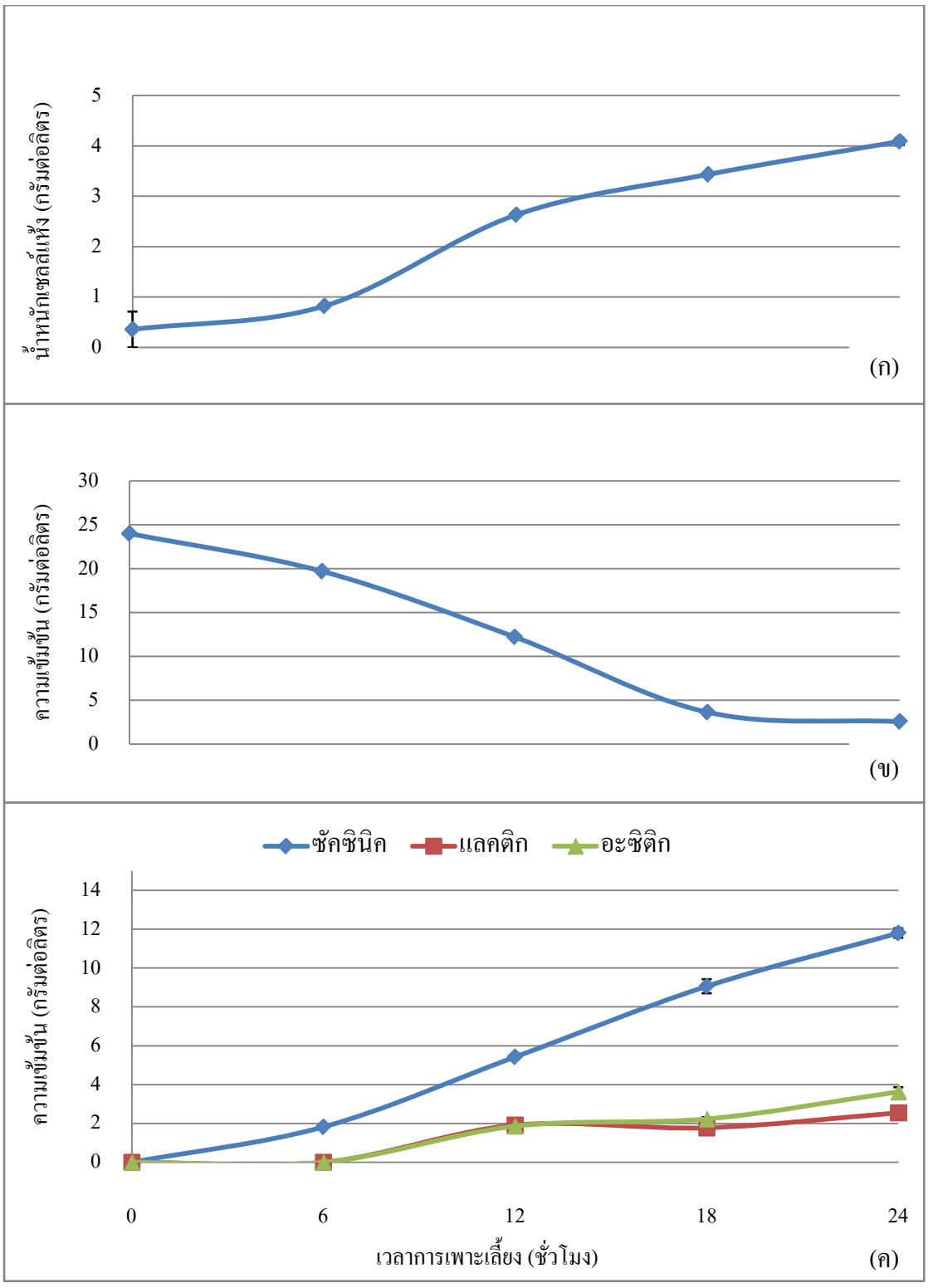
ภาพที่ 4-21 (ก) น้ำหนักเซลล์แห้ง (ข) ปริมาณการใช้น้ำตาล และ (ค) ผลิตภัณฑ์กรดอินทรีย์ที่ได้จากกระบวนการหมักเพื่อผลิตกรดซัคซินิคด้วยน้ำตาลกลูโคสเกรดสำหรับงานวิจัย

การศึกษาการใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนในกระบวนการหมักเพื่อผลิตกรดซัคซินิค ผลการทดลองจะเห็นได้ว่า จากภาพที่ 4-22 แบคทีเรียสามารถเจริญได้ดี เมื่อถึงเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งมีน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 2.66 กรัมต่อลิตร และมีปริมาณน้ำตาลคงเหลืออยู่มากถึง 7.66 กรัมต่อลิตร ในขณะที่สามารถผลิตกรดซัคซินิคได้สูงสุดที่เวลา 18 ชั่วโมง เท่ากับ 3.49 กรัมต่อลิตร ผลิตกรดแลกติกและกรดอะซิติก เท่ากับ 1.82 และ 2.42 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และหลังชั่วโมงที่ 18 ปริมาณผลิตภัณฑ์กรดที่ได้มีค่าลดลง (ภาพที่ 4-22)

และเมื่อศึกษาการใช้น้ำตาลที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตกรดซัคซินิค ผลการทดลองพบว่า แบคทีเรียเจริญได้ดีโดยมีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดที่เวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งมีค่าเท่ากับ 4.09 กรัมต่อลิตร และสามารถใช้น้ำตาลได้ดีโดยมีปริมาณน้ำตาลคงเหลือเท่ากับ 2.55 กรัมต่อลิตร ในขณะที่สามารถผลิตกรดซัคซินิคได้เท่ากับ 11.80 กรัมต่อลิตรที่เวลา 24 ชั่วโมง ผลิตกรดแลกติกและกรดอะซิติกเท่ากับ 2.55 และ 3.62 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (ภาพที่ 4-23)



ภาพที่ 4-22 (ก) น้ำหนักเซลล์แห้ง (ข) ปริมาณการใช้น้ำตาล และ (ค) ผลิตภัณฑ์กรดอินทรีย์ ที่ได้จากกระบวนการหมักเพื่อผลิตกรดซัคซินิคด้วยกลีเซอรอลเกรดสำหรับงานวิจัย



ภาพที่ 4-23 (ก) น้ำหนักเซลล์แห้ง (ข) ปริมาณการใช้น้ำตาล และ (ค) ผลิตภัณฑ์กรดอินทรีย์ ที่ได้จากการผลิตกรดซัคซินิคด้วยน้ำตาลที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง

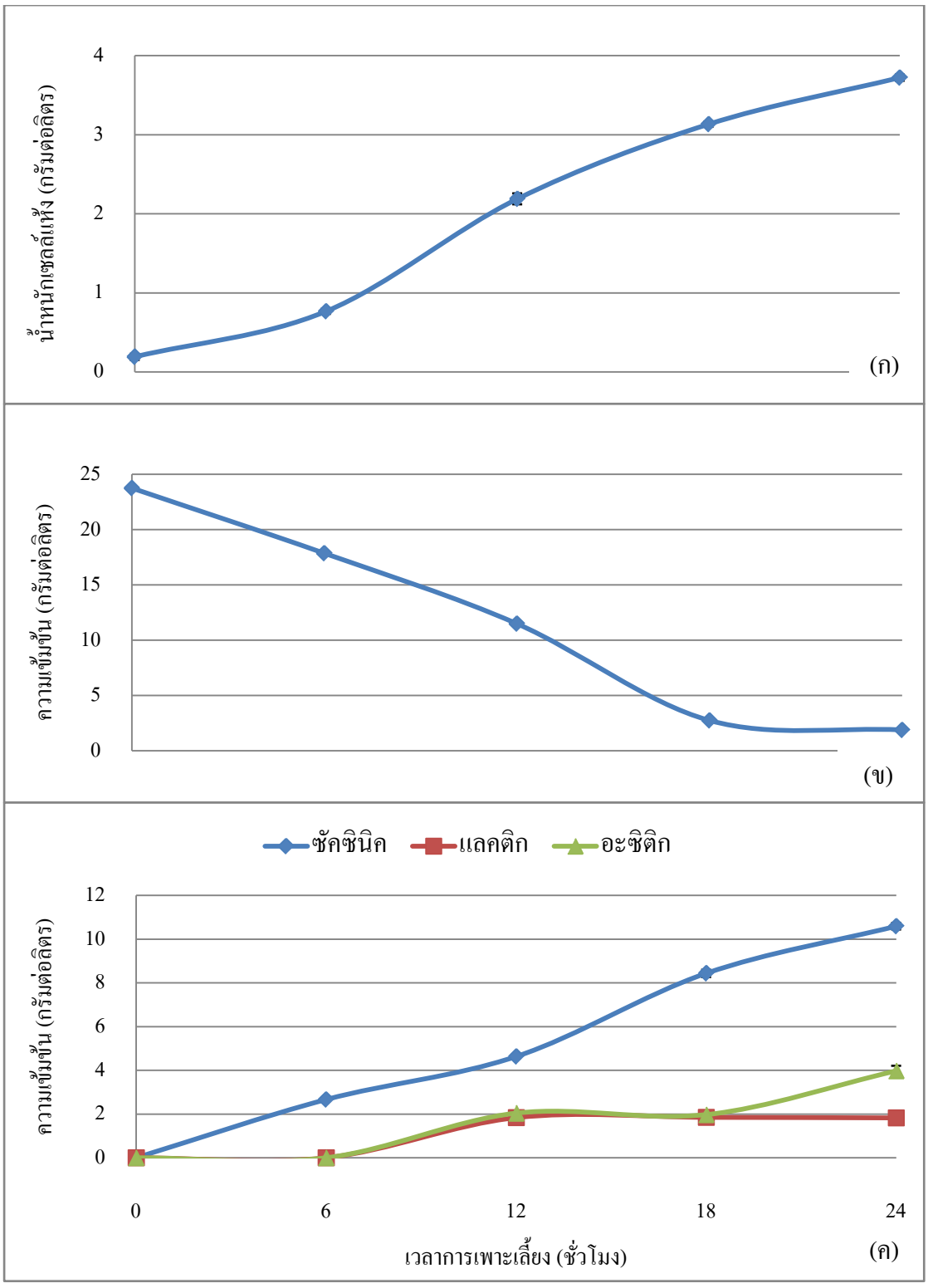
2.5 การเปรียบเทียบแหล่งคาร์บอเนตในสูตรอาหารสำหรับการผลิตกรดซัคซินิค

การศึกษาเปรียบเทียบการใช้แหล่งคาร์บอเนตที่แตกต่างกันคือ แมกนีเซียมคาร์บอเนต แมกนีเซียมไดไฮโดรเจนคาร์บอเนต โซเดียมคาร์บอเนต และโซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต เพื่อใช้ในการควบคุมค่าความเป็นกรดด่างและแตกตัวให้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญในกระบวนการผลิตกรดซัคซินิค โดยผลการทดลองพบว่าการใช้แมกนีเซียมคาร์บอเนตในการหมักสามารถผลิตกรดซัคซินิคได้เท่ากับ 10.59 กรัมต่อลิตร และผลิตกรดแลกติกและกรดอะซิติกได้ 1.83 และ 3.98 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (ภาพที่ 4-24)

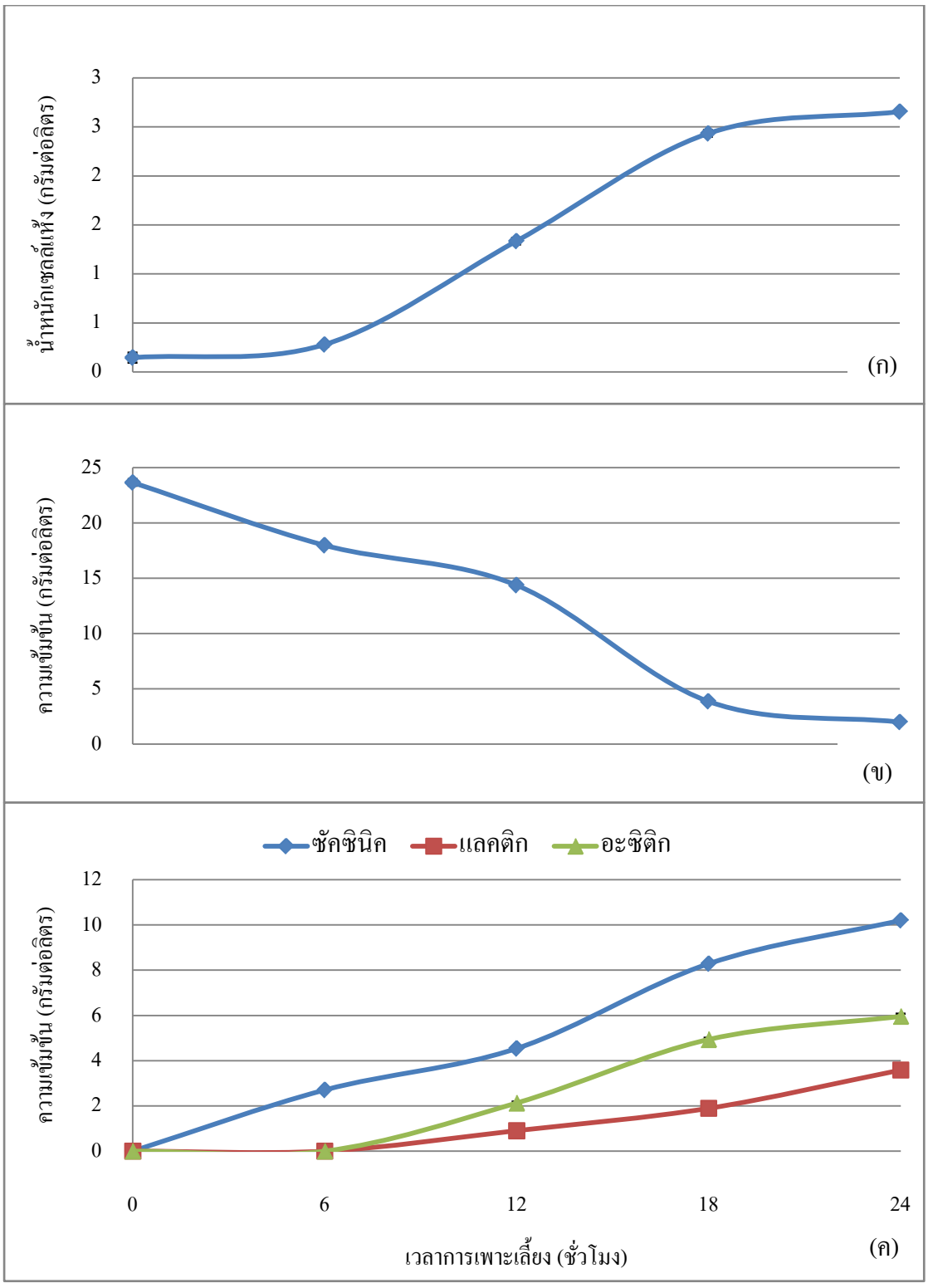
ผลการทดลองการใช้แมกนีเซียมไดไฮโดรเจนคาร์บอเนตเป็นแหล่งคาร์บอเนตในการผลิตกรดซัคซินิคพบว่า ความเข้มข้นของกรดซัคซินิค กรดแลกติก และกรดอะซิติก มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นในทิศทางเดียวกันตามระยะเวลาในการหมักจนถึงเวลา 24 ชั่วโมง สามารถผลิตกรดซัคซินิค กรดแลกติก และกรดอะซิติกได้เท่ากับ 10.20, 3.59 และ 5.96 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (ภาพที่ 4-25)

จากผลการทดลอง (ภาพที่ 4-26) การใช้โซเดียมคาร์บอเนตในการผลิตกรดซัคซินิคพบว่าแบคทีเรียมีความเข้มข้นของน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 4.09 กรัมต่อลิตร สามารถใช้น้ำตาลจนเหลือต่ำสุดที่เวลา 24 ชั่วโมง เท่ากับ 4.09 กรัมต่อลิตร และสามารถผลิตกรดซัคซินิค กรดแลกติก และกรดอะซิติกได้เท่ากับ 10.45, 3.87 และ 4.02 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

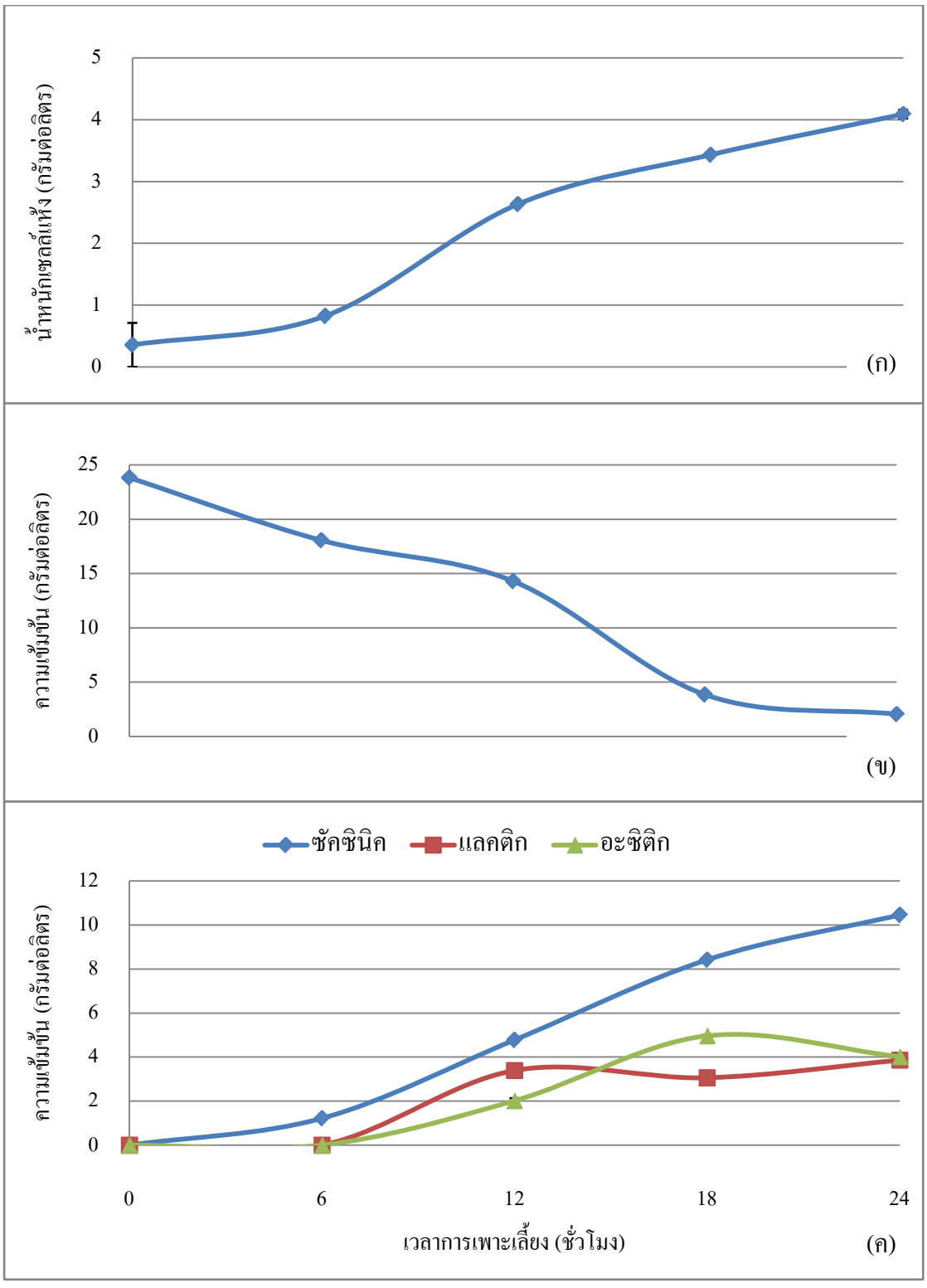
ในขณะที่ผลการทดลองการผลิตกรดซัคซินิคโดยใช้โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนตเป็นแหล่งคาร์บอเนต สามารถผลิตกรดซัคซินิค กรดแลกติก และกรดอะซิติก ได้เท่ากับ 10.79, 2.34 และ 4.29 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (ภาพที่ 4-27)



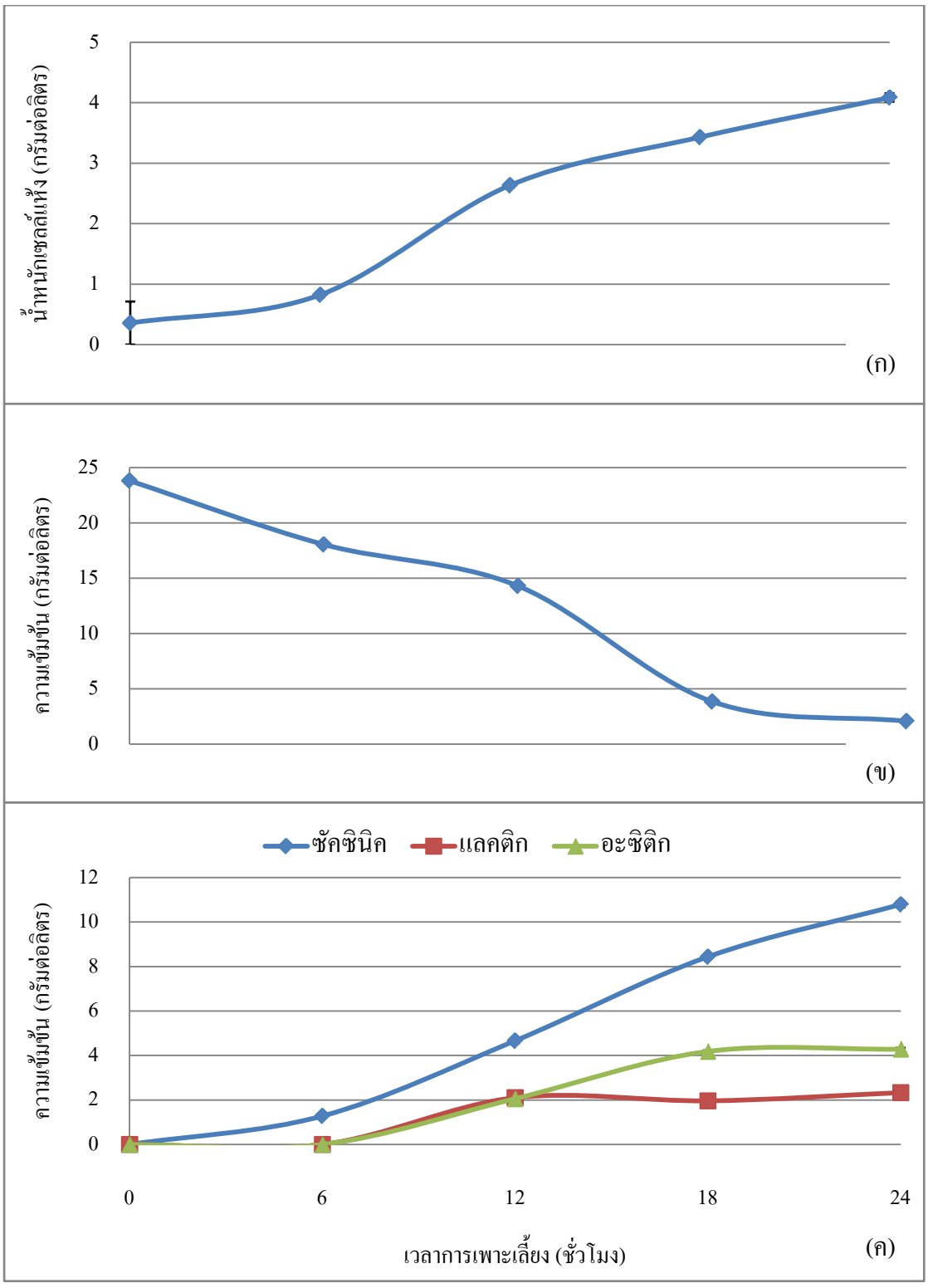
ภาพที่ 4-24 (ก) น้ำหนักเซลล์แห้ง (ข) ปริมาณการใช้น้ำตาล และ (ค) ผลิตภัณฑ์กรดอินทรีย์ ที่ได้จากการผลิตกรดซัคซินิคโดยใช้แมกนีเซียมคาร์บอเนต



ภาพที่ 4-25 (ก) น้ำหนักเซลล์แห้ง (ข) ปริมาณการใช้น้ำตาล และ (ค) ผลิตภัณฑ์กรดอินทรีย์ ที่ได้จากการผลิตกรดซัคซินิคโดยใช้แมกนีเซียมไดไฮโดรเจนคาร์บอเนต



ภาพที่ 4-26 (ก) น้ำหนักเซลล์แห้ง (ข) ปริมาณการใช้น้ำตาล และ (ค) ผลิตภัณฑ์กรดอินทรีย์ ที่ได้จากการผลิตกรดซัคซินิคโดยใช้โซเดียมคาร์บอเนต



ภาพที่ 4-27 (ก) น้ำหนักเซลล์แห้ง (ข) ปริมาณการใช้น้ำตาล และ (ค) ผลิตภัณฑ์กรดอินทรีย์ ที่ได้จากการผลิตกรดซัคซินิคโดยใช้โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต

โดยผลการทดลองการเปรียบเทียบแหล่งคาร์บอเนตในสูตรอาหารสำหรับการผลิตกรดซัคซินิคแสดงให้เห็นว่า การใช้แหล่งคาร์บอเนตทั้ง 4 ชนิดในกระบวนการหมักนั้น แบคทีเรียมีการเจริญและสามารถใช้น้ำตาลได้ดี ความสามารถในการผลิตกรดซัคซินิคเป็นไปในทิศทางเดียวกัน ซึ่งพบว่าความเข้มข้นของกรดซัคซินิคสูงสุดในทุกแหล่งคาร์บอเนตที่ใช้ในการทดลองไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<.05$) (ภาคผนวก ค) ในขณะที่การใช้แมกนีเซียมคาร์บอเนตในการหมักทำให้มีกรดแลกติกและกรดอะซิติกอยู่ปริมาณน้อย ซึ่งกรดทั้ง 2 ชนิดเป็นผลิตภัณฑ์ที่ไม่ต้องการในกระบวนการหมัก

3. การศึกษาการผลิตกรดซัคซินิคแบบกะ (Batch) ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

การผลิตกรดซัคซินิคแบบกะในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยมีปริมาณอาหารในการเพาะเลี้ยง (Working volume) เท่ากับ 4 ลิตร เป็นการศึกษาการขยายขนาดการผลิตจากเดิมที่เพาะเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร ซึ่งการเพาะเลี้ยงในถังหมักสามารถควบคุมสภาวะการหมักให้เหมาะสมได้อย่างสม่ำเสมอ มีการกวนผสมที่ดี ควบคุมค่าความเป็นกรดด่าง อุณหภูมิให้เหมาะสม อีกทั้งยังสามารถเติมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เข้าไปในกระบวนการหมักได้อย่างต่อเนื่อง การศึกษา การผลิตกรดซัคซินิคในถังหมักขนาด 5 ลิตร มีสภาวะที่แตกต่างกันซึ่งทำการทดลอง 4 สภาวะด้วยกันคือ ถังหมัก 1, 2, 3 และถังหมัก 4 เมื่อได้ผลการทดลองแล้วจึงนำผลการทดลองที่ได้มาใช้ในการประกอบการตัดสินใจเพื่อใช้ในการผลิตในถังหมักถัดไป เพื่อให้ได้สภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตกรดซัคซินิค

ถังหมัก 1

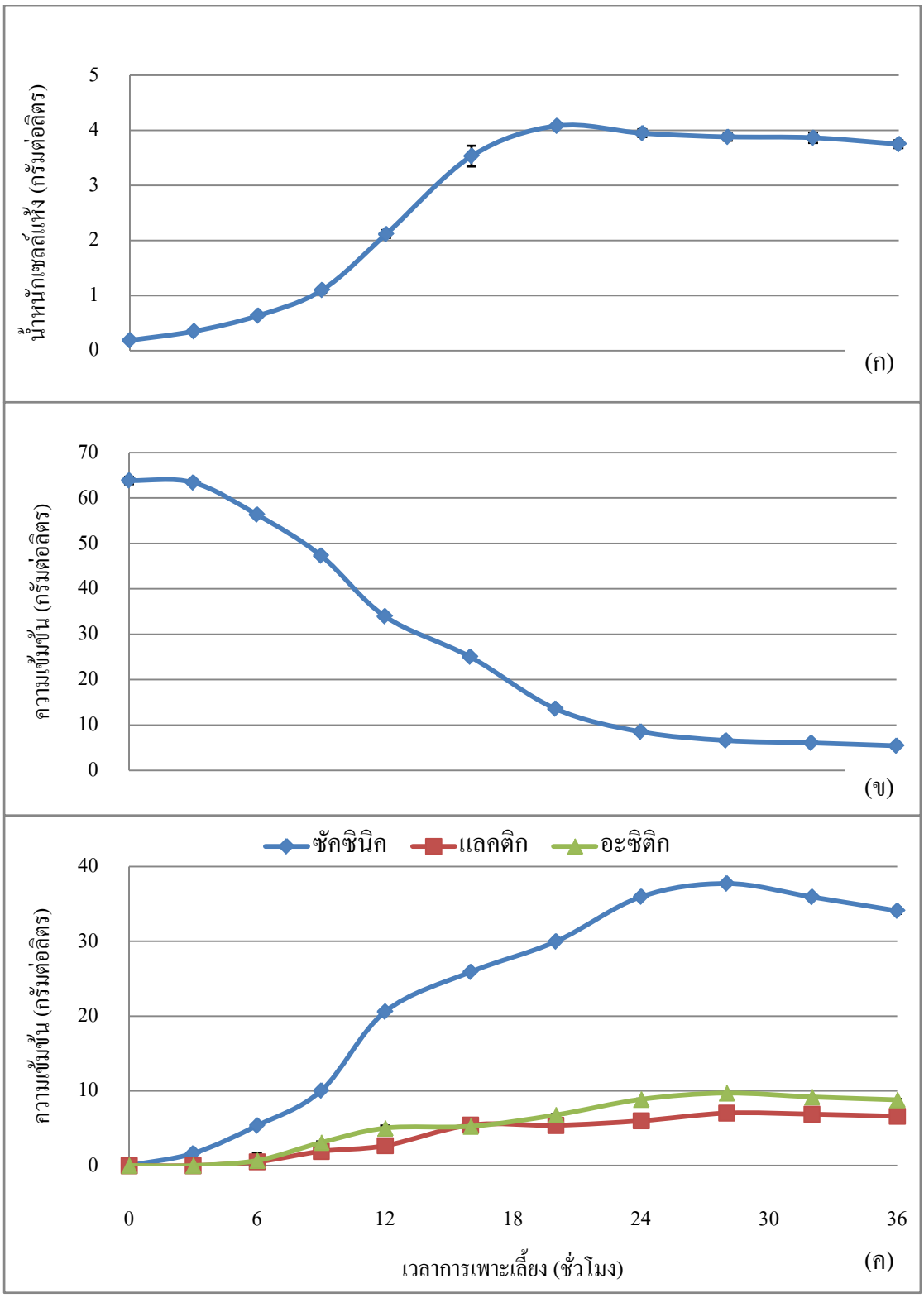
จากการศึกษาการผลิตกรดซัคซินิคในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้สูตรอาหารของถังหมัก 1 ตาม ตารางที่ 3-1 ซึ่งมีสภาวะค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 6.9 อุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียส มีอัตราการใส่ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 0.5 vvm. อัตราการกวนผสมที่ เวลา 0 – 2 ชั่วโมงเท่ากับ 200 รอบต่อนาที ที่เวลา 2 – 12 เท่ากับ 300 รอบต่อนาที และที่เวลา 12 – 36 ชั่วโมง เท่ากับ 400 รอบต่อนาที ใช้หัวเชื้อร้อยละ 5 โดยปริมาตรต่อปริมาตร และทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 36 ชั่วโมง ผลการทดลองพบว่า แบคทีเรียมีการเจริญอย่างรวดเร็วที่เวลา 0 – 20 ชั่วโมง โดยที่เวลา 20 ชั่วโมงมีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 4.08 กรัมต่อลิตร และหลังจากนั้นมีแนวโน้มคงที่จนกระทั่งสิ้นการทดลอง การเพาะเลี้ยงมีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 63.89 กรัมต่อลิตร และ

มีปริมาณลดลงเรื่อย ๆ จากการนำไปใช้ของแบคทีเรียเพื่อผลิตกรดซัคซินิคจนถึงชั่วโมงที่ 36 มีค่าเท่ากับ 5.43 กรัมต่อลิตร สำหรับการผลิตกรดซัคซินิคมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นเรื่อย ๆ จนมีค่าสูงสุดที่ที่เวลา 28 ชั่วโมงเท่ากับ 37.74 กรัมต่อลิตร ส่วนผลิตภัณฑ์กรดอื่นที่ไม่ต้องการคือ กรดแลกติกและกรดอะซิติกก็มีค่าเพิ่มสูงขึ้นตามทิศทางของกรดซัคซินิคโดยมีค่าสูงสุดเท่ากับ 7.03 และ 9.71 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ที่เวลา 28 ชั่วโมงเช่นเดียวกัน (ภาพที่ 4-28)

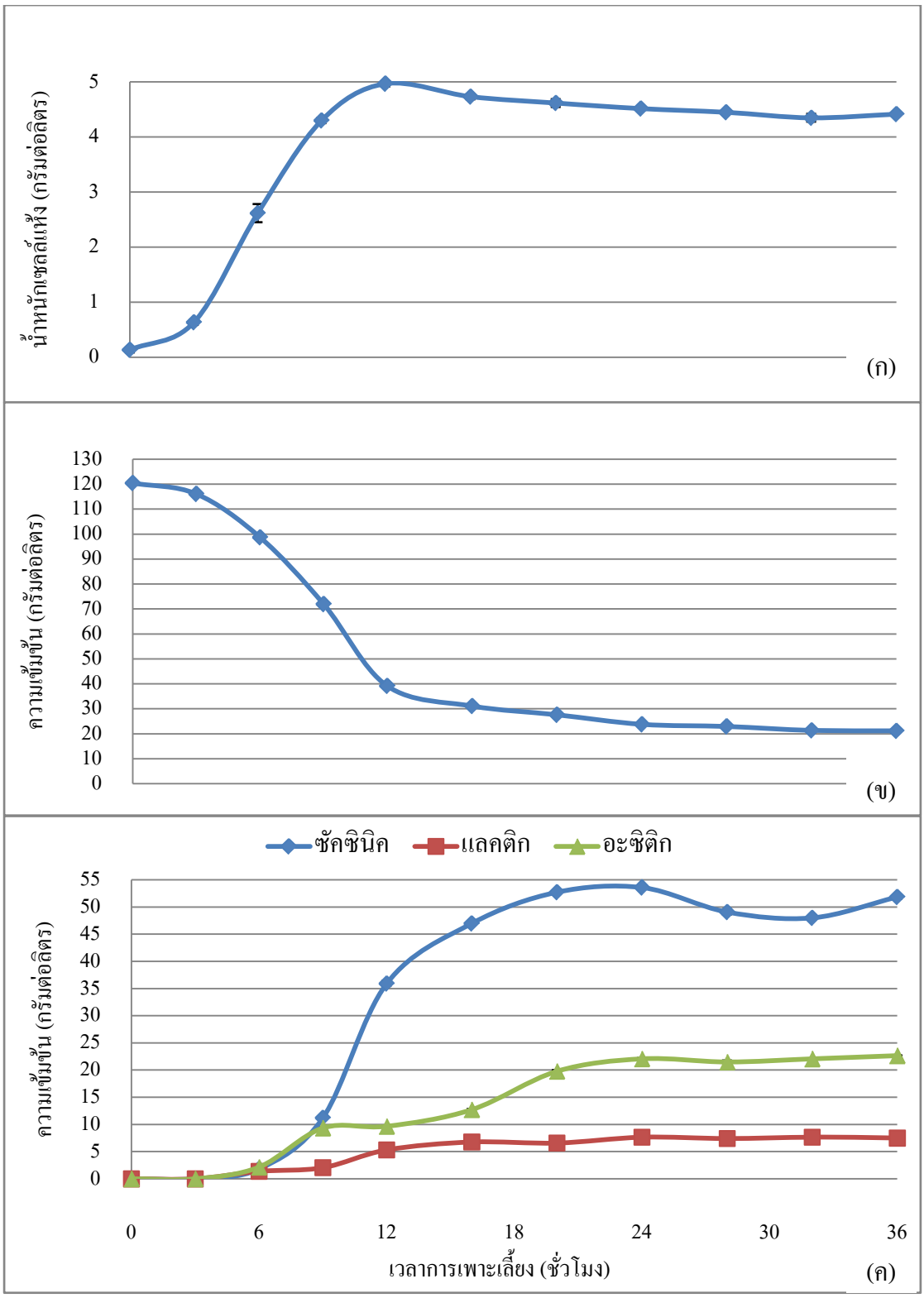
ถังหมัก 2

จากผลการศึกษาการผลิตกรดซัคซินิคในถังหมัก 1 ซึ่งได้ผลลัพธ์ที่ดี จึงนำมาปรับใช้ในถังหมัก 2 โดยใช้น้ำตาลเริ่มต้นที่สูงขึ้นเท่ากับ 120.49 กรัมต่อลิตร และเพิ่มความเข้มข้นขององค์ประกอบในสูตรอาหารเป็น 2 เท่าตามการเพิ่มของน้ำตาลที่ใช้เริ่มต้น ทำการเพาะเลี้ยงที่ค่าความเป็นกรดด่าง อุณหภูมิ ขนาดของหัวเชื้อเช่นเดิมกับถังหมัก 1 แต่มีการเพิ่มอัตราการกวนผสมคือ เวลา 0 – 6 ชั่วโมงเท่ากับ 400 รอบต่อนาที ที่เวลา 6 – 12 เท่ากับ 550 รอบต่อนาที และที่เวลา 12 – 36 ชั่วโมง เท่ากับ 500 รอบต่อนาที (ตารางที่ 3-1)

ผลการทดลองการผลิตกรดซัคซินิคในถังหมัก 2 พบว่า แบคทีเรียสามารถเจริญได้รวดเร็วตั้งแต่เวลา 0 – 12 ชั่วโมง โดยที่เวลา 12 ชั่วโมงมีค่าเท่ากับ 4.97 กรัมต่อลิตร และมีแนวโน้มลดลงทีละน้อยจนถึงชั่วโมงที่ 36 ขณะที่ปริมาณน้ำตาลถูกใช้อย่างรวดเร็วตั้งแต่เวลา 0 – 12 ชั่วโมงเช่นเดียวกัน และลดลงเรื่อย ๆ จนถึงชั่วโมงที่ 36 มีปริมาณน้ำตาลคงเหลือเท่ากับ 21.11 กรัมต่อลิตร สำหรับกรดซัคซินิคที่ผลิตได้มีความเข้มข้นที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<.05) (ภาคผนวก ค) โดยเพิ่มสูงอย่างรวดเร็วตั้งแต่เวลา 6 ชั่วโมง จนมีความเข้มข้นสูงสุดที่เวลา 24 ชั่วโมง เท่ากับ 53.60 กรัมต่อลิตร ขณะที่กรดแลกติกและกรดอะซิติกก็มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นเรื่อย ๆ จนมีค่าสูงสุดที่เวลา 36 ชั่วโมงเท่ากับ 7.51 และ 22.66 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (ภาพที่ 4-29)



ภาพที่ 4-28 (ก) น้ำหนักเซลล์แห้ง (ข) ปริมาณการใช้น้ำตาล และ (ค) ผลิตภัณฑ์กรดอินทรีย์ ที่ได้จากการผลิตกรดซัคซินิคของถังหมัก 1

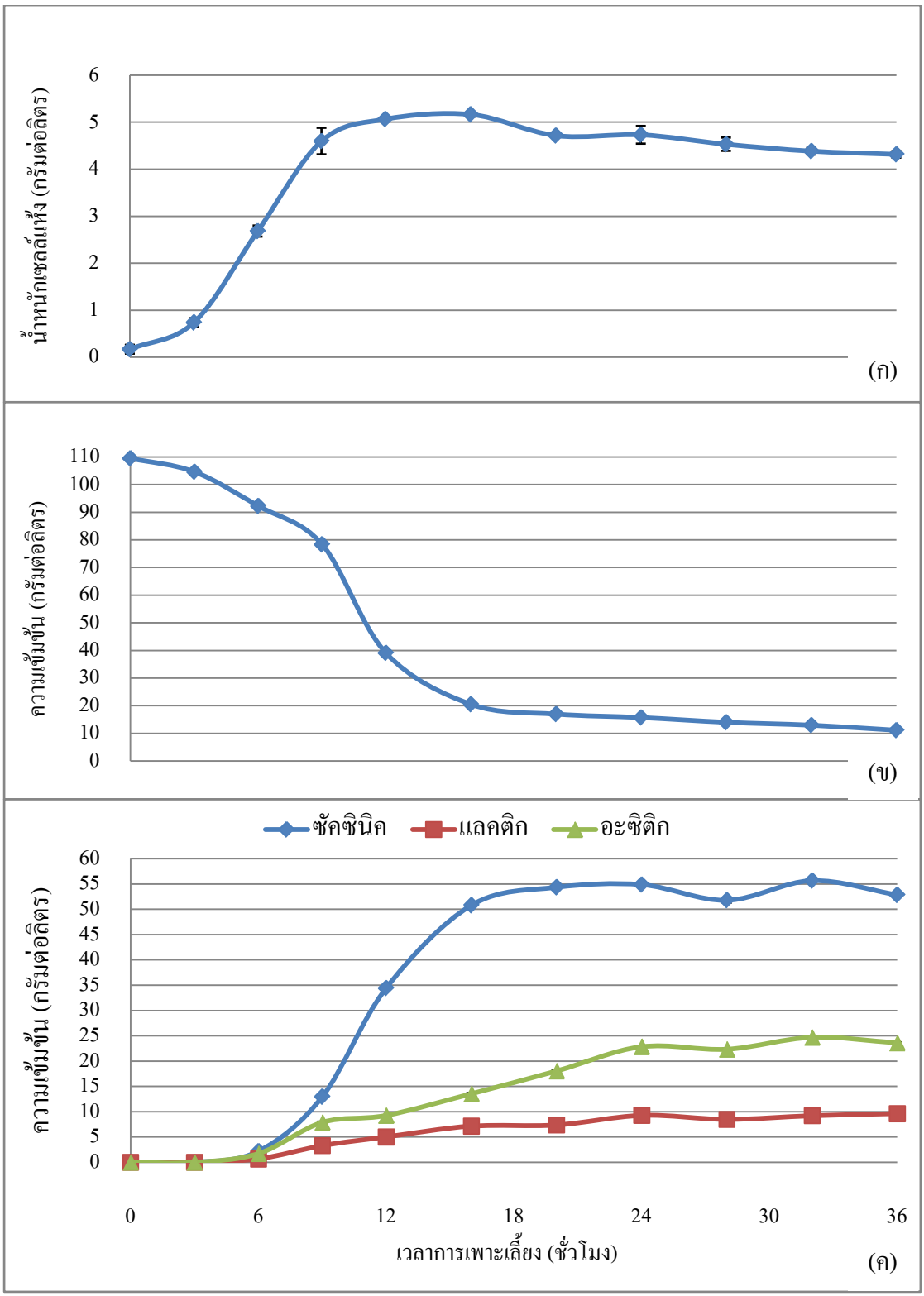


ภาพที่ 4-29 (ก) น้ำหนักเซลล์แห้ง (ข) ปริมาณการใช้น้ำตาล และ (ค) ผลิตภัณฑ์กรดอินทรีย์ ที่ได้จากการผลิตกรดซัคซินิคของถังหมัก 2

ถังหมัก 3

จากผลการศึกษาการผลิตกรดซัคซินิคของถังหมัก 2 นำมาสู่การทดลองในถังหมัก 3 โดยการเพิ่มปริมาณองค์ประกอบในสูตรอาหารให้สูงขึ้นเพื่อให้เพียงพอต่อการเจริญของแบคทีเรีย เพื่อจะได้ใช้น้ำตาลให้ได้มากที่สุดและผลิตกรดซัคซินิคได้สูงสุด และปรับอัตราการกวนผสมดังนี้ เวลา 0 – 6 ชั่วโมงเท่ากับ 400 รอบต่อนาที และที่เวลา 6 – 36 ชั่วโมง เท่ากับ 550 รอบต่อนาที ส่วนสภาวะอื่น ๆ ยังคงเดิม

ผลการศึกษาการผลิตกรดซัคซินิคในถังหมัก 3 พบว่า แบคทีเรียมีการเจริญอย่างรวดเร็ว ที่เวลา 0 - 16 ชั่วโมง มีค่าน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดที่เวลา 16 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 5.17 กรัมต่อลิตร และมีค่าลดต่ำลง สำหรับปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 109.54 กรัมต่อลิตร ซึ่งถูกใช้ไปอย่างรวดเร็ว จนถึงชั่วโมงที่ 16 และมีแนวโน้มลดลงทีละนิด โดยมีปริมาณน้ำตาลคงเหลือต่ำสุดเท่ากับ 11.11 กรัมต่อลิตรที่เวลา 36 ชั่วโมง สำหรับผลการผลิตกรดซัคซินิคพบว่า ความเข้มข้นของกรดซัคซินิคที่เวลาต่าง ๆ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<.05$) (ภาคผนวก ค) โดยเพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็วในเวลาที่ 6 - 24 ชั่วโมง และที่เวลา 24 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 54.86 กรัมต่อลิตร ในขณะที่กรดแลกติกและกรดอะซิติกมีแนวโน้มการเพิ่มขึ้นตามกรดซัคซินิคเช่นเดียวกัน โดยที่เวลา 24 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 9.28 และ 22.84 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (ภาพที่ 4-30)



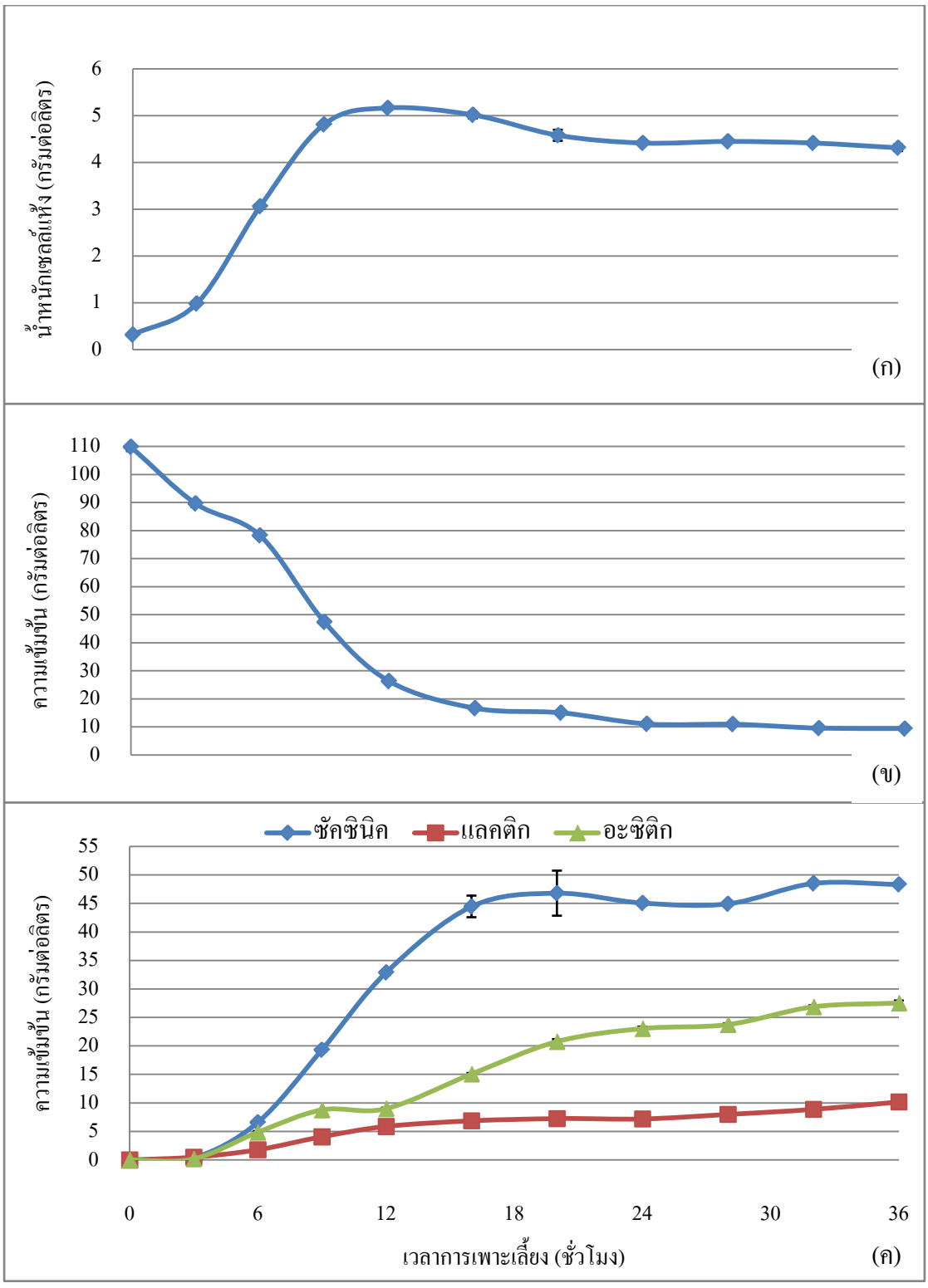
ภาพที่ 4-30 (ก) น้ำหนักเซลล์แห้ง (ข) ปริมาณการใช้น้ำตาล และ (ค) ผลิตภัณฑ์กรดอินทรีย์ ที่ได้จากการผลิตกรดซัคซินิคของถังหมัก 3

ถังหมัก 4

จากผลการศึกษาการผลิตกรดซัคซินิคในถังหมัก 3 นำมาสู่การพัฒนาในถังหมัก 4 โดยมีสภาวะการเพาะเลี้ยงเช่นเดียวกับถังหมัก 3 แต่มีการใช้หัวเชื้อที่มีสูตรอาหารใหม่และเพิ่มขนาดของหัวเชื้อเป็นร้อยละ 10 โดยปริมาตรต่อปริมาตร เพื่อต้องการเพิ่มเซลล์ของแบคทีเรียให้สูงขึ้นซึ่งเป็นผลให้สามารถผลิตกรดซัคซินิคได้รวดเร็วขึ้น

จากภาพที่ 4-31 แสดงผลการศึกษาการผลิตกรดซัคซินิคในถังหมัก 4 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียมีการเจริญอย่างรวดเร็วตั้งแต่เวลา 0 – 12 ชั่วโมง ซึ่งมีค่าเท่ากับ 5.17 กรัมต่อลิตร สำหรับปริมาณน้ำตาลถูกใช้อย่างรวดเร็วจนมีค่าต่ำสุดเท่ากับ 9.44 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 36 ชั่วโมง และกรดซัคซินิคมีความเข้มข้นเพิ่มสูงขึ้นตั้งแต่ชั่วโมงที่ 3 ถึง ชั่วโมงที่ 20 โดยที่เวลา 20 ชั่วโมงพบว่ามีความเข้มข้นกรดซัคซินิคเท่ากับ 46.83 กรัมต่อลิตร และเมื่อเปรียบเทียบกับความเข้มข้นของกรดซัคซินิคที่ผลิตได้ในเวลาหลังจากนั้นจนสิ้นสุดกระบวนการหมัก พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

จากผลการทดลองการผลิตกรดซัคซินิคแบบกะในถังหมักขนาด 5 ลิตร ทั้งหมด 4 ถังหมัก แสดงให้เห็นว่า การเพาะเลี้ยงแบบกะของถังหมัก 1 ซึ่งเริ่มต้นด้วยการใช้ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นในระดับที่ต่ำ (63.89 กรัมต่อลิตร) แบคทีเรียสามารถใช้น้ำตาลได้อย่างมีประสิทธิภาพ สังเกตได้จากปริมาณน้ำตาลคงเหลือที่ต่ำ (6.59 กรัมต่อลิตร) สามารถผลิตกรดซัคซินิคได้สูงสุด 37.74 กรัมต่อลิตรที่เวลา 28 ชั่วโมง และมีผลผลิตกรดซัคซินิคต่อน้ำตาลที่ใช้ไป (Succinic Yield) สูงถึง 0.66 กรัมต่อกรัม ในขณะที่มีอัตราการผลิตกรดซัคซินิคเท่ากับ 1.348 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ผลการทดลองข้างต้นนำไปสู่การปรับปรุงสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อโดยการเพิ่มปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นและองค์ประกอบต่าง ๆ ในสูตรอาหารเป็น 2 เท่าตามการเพิ่มขึ้นของน้ำตาลเริ่มต้น นอกจากนี้ยังเพิ่มอัตราการกวนผสมให้สูงขึ้น ผลปรากฏว่าสามารถผลิตกรดซัคซินิคและมีอัตราการผลิตกรดซัคซินิคที่เพิ่มสูงขึ้น เท่ากับ 53.6 กรัมต่อลิตร และ 2.23 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ แต่มีผลผลิตกรดซัคซินิคต่อน้ำตาลที่ใช้ไปต่ำลง (0.55 กรัมต่อกรัม) และยังคงมีปริมาณน้ำตาลคงเหลืออยู่มาก (23.72 กรัมต่อลิตร) ที่เวลา 24 ชั่วโมง (ตารางที่ 4-4)



ภาพที่ 4-31 (ก) น้ำหนักเซลล์แห้ง (ข) ปริมาณการใช้น้ำตาล และ (ค) ผลิตภัณฑ์กรดอินทรีย์ ที่ได้จากการผลิตกรดซัคซินิคของถังหมัก 4

และเมื่อนำผลการทดลองในถังหมัก 2 นำมาปรับใช้ในถังหมัก 3 โดยการเพิ่มความเข้มข้นขององค์ประกอบในสูตรอาหารให้สูงขึ้น อีกทั้งยังเพิ่มอัตราการกวนผสมที่มากขึ้น ซึ่งพบว่าสามารถผลิตกรดซัคซินิคได้สูงขึ้น (54.86 กรัมต่อลิตร) ที่เวลา 24 ชั่วโมง และมีการเพิ่มขึ้นของผลผลิตกรดซัคซินิคต่อน้ำตาลที่ใช้ไปและอัตราการผลิตกรดซัคซินิคเพียงเล็กน้อย และผลที่ได้นำมาสู่การเพาะเลี้ยงในถังหมัก 4 ที่ต้องการเพิ่มเซลล์แบคทีเรียให้สูงขึ้นโดยใช้หัวเชื้อสูตรใหม่ (หัวเชื้อ 2) และเพิ่มความเข้มข้นของหัวเชื้อให้เท่ากับร้อยละ 10 โดยปริมาตรต่อปริมาตร ผลปรากฏว่าชั่วโมงที่ 20 ในกระบวนการหมักสามารถผลิตกรดซัคซินิคได้ 46.83 กรัมต่อลิตร และมีอัตราการผลิตที่สูงขึ้นเท่ากับ 2.342 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง (ตารางที่ 4-4)

ตารางที่ 4-4 การผลิตกรดซัคซินิคแบบกะ (Batch) ด้วยแบคทีเรียหมายเลข 37 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

Fermentation	**Initial glucose (g/L)**	**Residual glucose (g/L)**	**Succinic (g/L)**	**Succinic Yield (g/ g)**	**Efficiency (%)**	**Productivity (g/L/h)**
Batch 1	63.89	6.59	37.74±0.14 [a]	0.66±0 [c]	98.30±0.37 [c]	1.35±0.01 [a]
Batch 2	120.49	23.72	53.60±0.06 [c]	0.55±0 [b]	82.67±0.10 [b]	2.23±0.00 [b]
Batch 3	109.54	15.67	54.86±0.08 [c]	0.58±0 [b]	87.23±0.13 [b]	2.29±0.00 [b]
Batch 4	109.76	15.04	46.83±3.95 [b]	0.49±0 [a]	73.79±6.23 [a]	2.34±0.20 [b]

"หมายเหตุ" Batch 1, 2, 3 ,4 คือ ถังหมัก 1, 2, 3, 4

Initial glucose คือ ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)

Residual glucose คือ ปริมาณน้ำตาลคงเหลือ (กรัมต่อลิตร)

Succinic Yield คือ ผลผลิตกรดซัคซินิคต่อน้ำตาลที่ใช้ไป (กรัมต่อกรัม)

Efficiency คือ ประสิทธิภาพการผลิต (%)

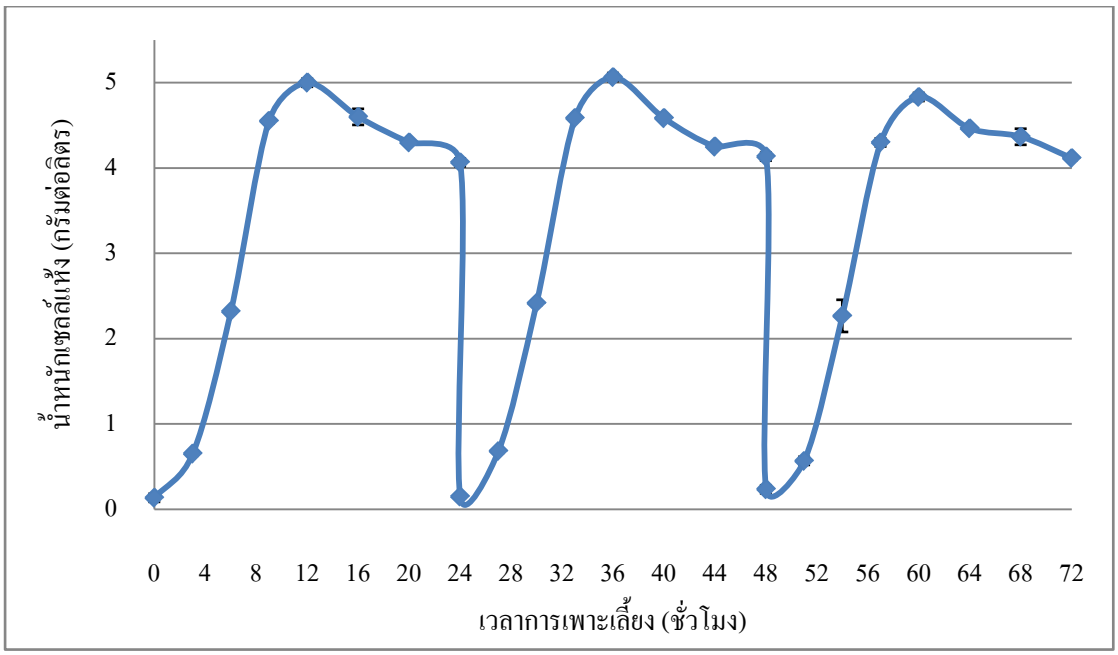
Productivity คือ อัตราการผลิตกรดซัคซินิค (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)

4. การศึกษาเทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบหลายกะลำดับต่อเนื่อง (Multiple sequential batch) ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

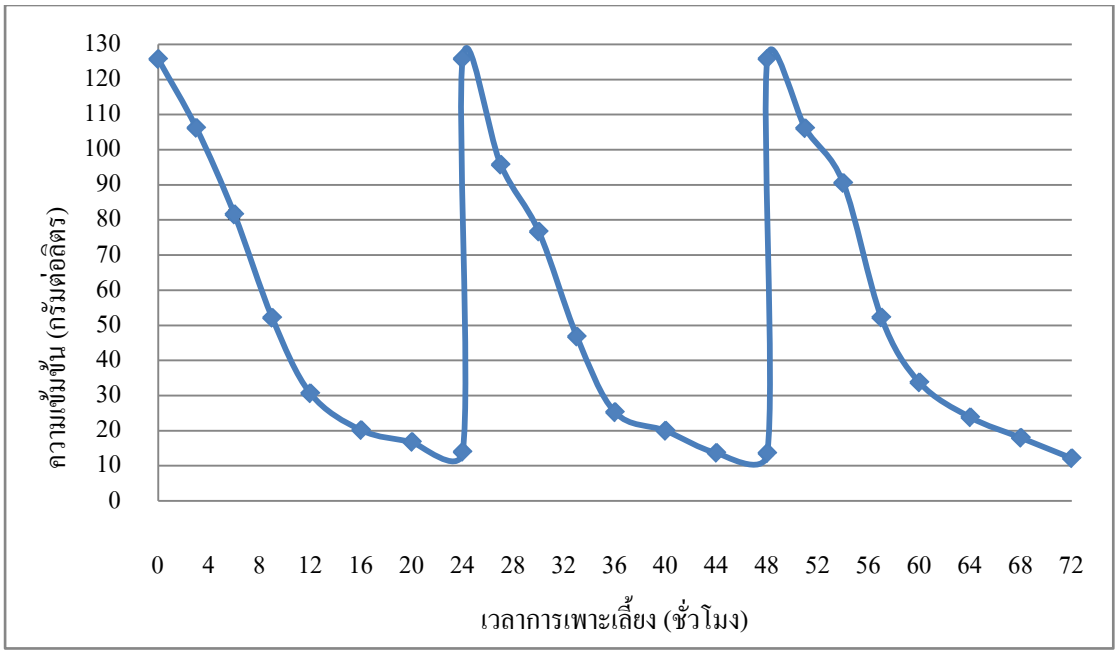
การศึกษาการเพาะเลี้ยงแบบหลายกะลำดับต่อเนื่องในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยทำการเตรียมสูตรอาหารและสภาวะที่ดีที่สุดที่ได้จากการทดลองหัวข้อที่ 3 ดำเนินการเพาะเลี้ยงตาม

ขั้นตอนเดียวกัน เพื่อทำการเพาะเลี้ยงแบบกะครั้งที่ 1 เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการถ่ายน้ำหมักออก เหลือไว้เพียง 200 มิลลิลิตร (คิดเป็นร้อยละ 5 โดยปริมาตรต่อปริมาตรของ 4 ลิตร) เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อเริ่มต้นของการเพาะเลี้ยงแบบกะครั้งต่อไป จากนั้นเติมอาหารชุดใหม่ที่มีส่วนประกอบและความเข้มข้นเท่าเดิม ปริมาตร 3,800 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงตามปกติ เมื่อครบตามระยะเวลาการเพาะเลี้ยงที่กำหนดจึงทำซ้ำอีก 1 ครั้ง (รวมทั้งสิ้น 3 ครั้ง)

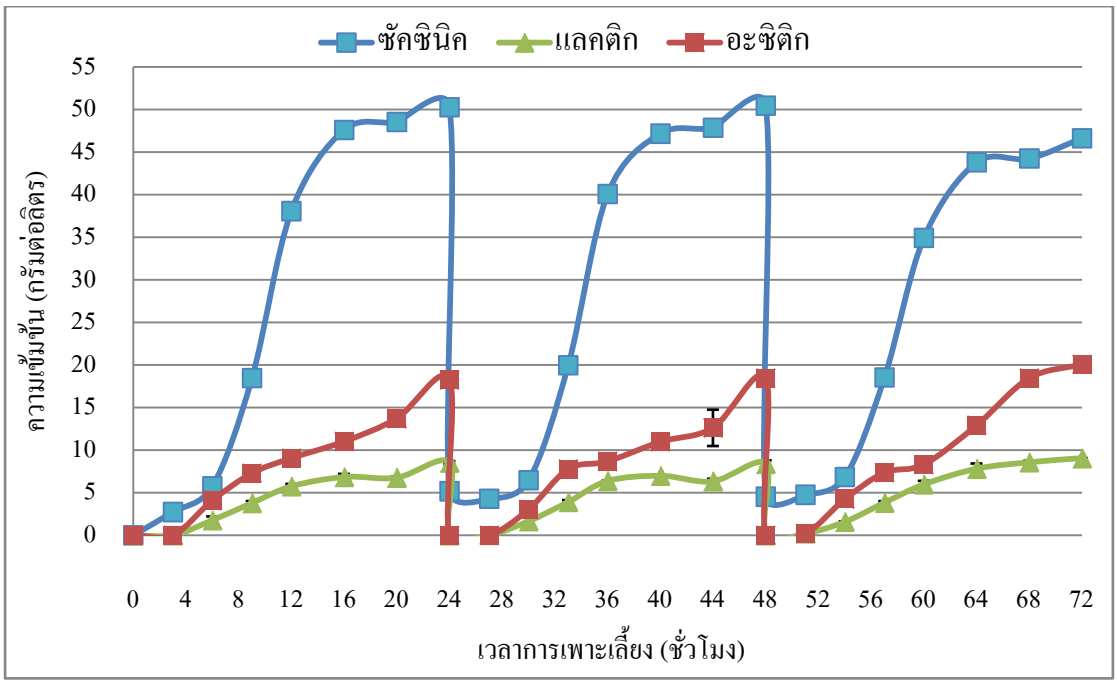
ผลการศึกษา การเพาะเลี้ยงแบบหลายกะลำดับต่อเนื่อง พบว่า การเพาะเลี้ยงแบบกะครั้งที่ 1 แบคทีเรียมีการเจริญอย่างรวดเร็ว โดยมีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 5.00 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 12 ชั่วโมง และมีค่าต่ำลงเท่ากับ 4.07 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 24 ชั่วโมง (ภาพที่ 4-32) มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 125.76 กรัมต่อลิตร และลดลงต่ำสุดเท่ากับ 13.94 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 4-33) สามารถผลิตกรดซัคซินิคได้สูงสุดที่เวลา 24 ชั่วโมง เท่ากับ 50.28 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตกรดแลกติกและกรดอะซิติกเท่ากับ 8.52 และ 18.25 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (ภาพที่ 4-32) (สิ้นสุดการเพาะเลี้ยงครั้งที่ 1) หลังจากนั้นเมื่อทำการเปลี่ยนอาหารเพื่อเข้าสู่การเพาะเลี้ยงแบบกะ ครั้งที่ 2 พบว่า ผลการทดลองมีแนวโน้มเช่นเดียวกับครั้งที่ 1 โดยมีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 5.07 กรัมต่อลิตร มีปริมาณน้ำตาลคงเหลือต่ำสุดเท่ากับ 13.52 กรัมต่อลิตร จากน้ำตาลเริ่มต้น 125.88 กรัมต่อลิตร และสามารถผลิตกรดซัคซินิคได้สูงสุดเท่ากับ 50.48 กรัมต่อลิตร มีกรดแลกติกและกรดอะซิติกเท่ากับ 8.38 และ 18.45 กรัมต่อลิตร (สิ้นสุดการเพาะเลี้ยงครั้งที่ 2) หลังจากนั้นเมื่อทำการเปลี่ยนอาหารเพื่อเข้าสู่การเพาะเลี้ยงแบบกะ ครั้งที่ 3 พบว่า ผลการทดลองมีแนวโน้มเดียวกับครั้งที่ผ่านมา โดยมีน้ำหนักเซลล์แห้งที่ต่ำกว่า ซึ่งเท่ากับ 4.83 กรัมต่อลิตร เมื่อสิ้นสุดการเพาะเลี้ยงมีปริมาณน้ำตาลคงเหลือเท่ากับ 12.13 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตกรดซัคซินิคได้ 46.63 กรัมต่อลิตร ผลิตกรดแลกติกและกรดอะซิติกได้เท่ากับ 9.04 และ 20.08 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ



ภาพที่ 4-32 น้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้จากการผลิตกรดซัคซินิคของการเพาะเลี้ยงแบบหลายกะลำดับต่อเนื่อง



ภาพที่ 4-33 ปริมาณการใช้น้ำตาลที่ได้จากการผลิตกรดซัคซินิคของการเพาะเลี้ยงแบบหลายกะลำดับต่อเนื่อง



ภาพที่ 4-34 ผลิตภัณฑ์กรดอินทรีย์ที่ได้จากการผลิตกรดซัคซินิคของการเพาะเลี้ยงแบบหลายกะลำดับต่อเนื่อง

จากตารางที่ 4-5 พบว่าการเพาะเลี้ยงในกะที่ 1 และ 2 นั้น ผลการทดลองความเข้มข้นของกรดซัคซินิคไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) โดยสามารถผลิตกรดซัคซินิคได้ 50.28 และ 46.64 กรัมต่อลิตร มีผลผลิตต่อน้ำตาลที่ใช้ไปเท่ากับ 0.45 กรัมต่อกรัมเท่ากัน และมีอัตราการผลิตกรดซัคซินิคเท่ากับ 2.095 และ 2.103 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) กับผลการทดลองกะ 3 ซึ่งสามารถผลิตกรดซัคซินิคได้ 46.46 กรัมต่อลิตร ผลผลิตต่อน้ำตาลที่ใช้ไปเท่ากับ 0.41 กรัมต่อกรัม และมีอัตราการผลิตกรดซัคซินิคเท่ากับ 1.943 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

ตารางที่ 4-5 การผลิตกรดซัคซินิคด้วยแบคทีเรียหมายเลข 37 ด้วยการเพาะเลี้ยงแบบหลายกะลำดับต่อเนื่อง

Fermentation	Initial glucose (g/L)	Residual glucose (g/L)	Succinic (g/L)	Succinic Yield (g/ g)	Efficiency (%)	Productivity (g/L/h)
Multiple sequential batch (I)	125.77	13.95	50.28±0.38 [b]	0.45±0 [b]	67.11±0.51 [b]	2.10±2.10 [b]
Multiple sequential batch (II)	125.88	13.53	50.48±0.17 [b]	0.45±0 [b]	67.06±0.23 [b]	2.10±2.10 [b]
Multiple sequential batch (III)	125.91	12.14	46.64±0.12 [a]	0.41±0 [a]	61.18±0.16 [a]	1.94±1.94 [a]

“หมายเหตุ” Multiple sequential batch (I), (II), (III) คือ การเพาะเลี้ยงแบบหลายกะลำดับต่อเนื่องกะ 1, 2, 3

Initial glucose คือ ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)

Residual glucose คือ ปริมาณน้ำตาลคงเหลือ (กรัมต่อลิตร)

Succinic Yield คือ ผลผลิตกรดซัคซินิคต่อน้ำตาลที่ใช้ไป (กรัมต่อกรัม)

Efficiency คือ ประสิทธิภาพการผลิต (%)

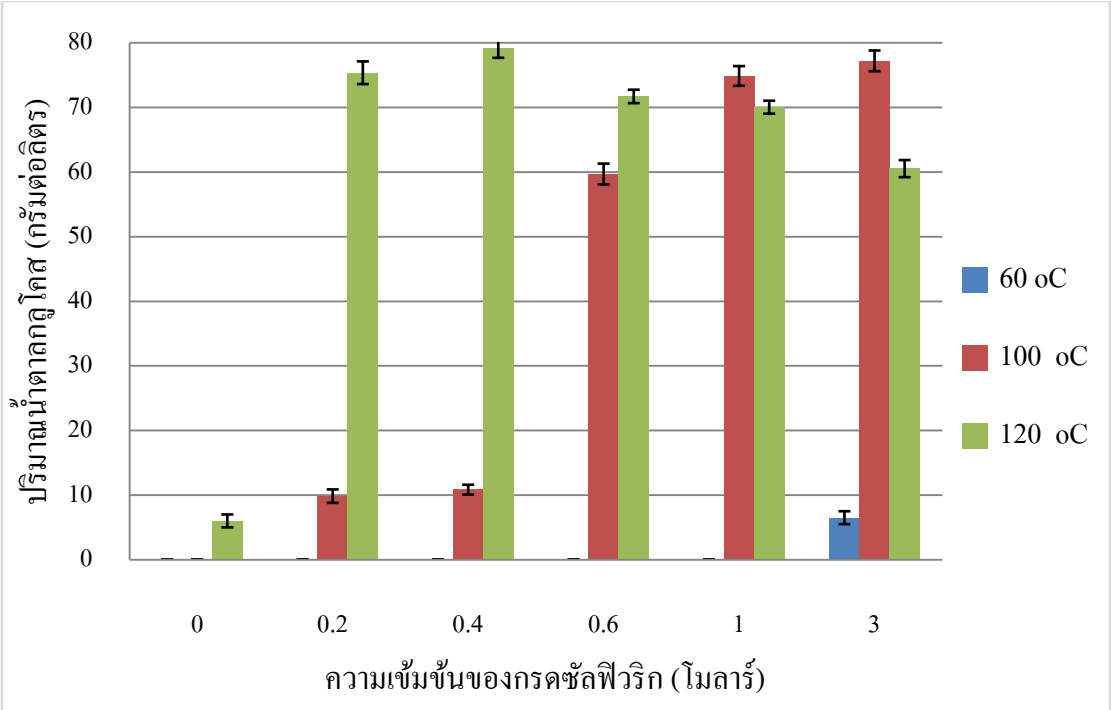
Productivity คือ อัตราการผลิตกรดซัคซินิค (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)

5. การศึกษาการใช้กากมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตกรดซัคซินิค

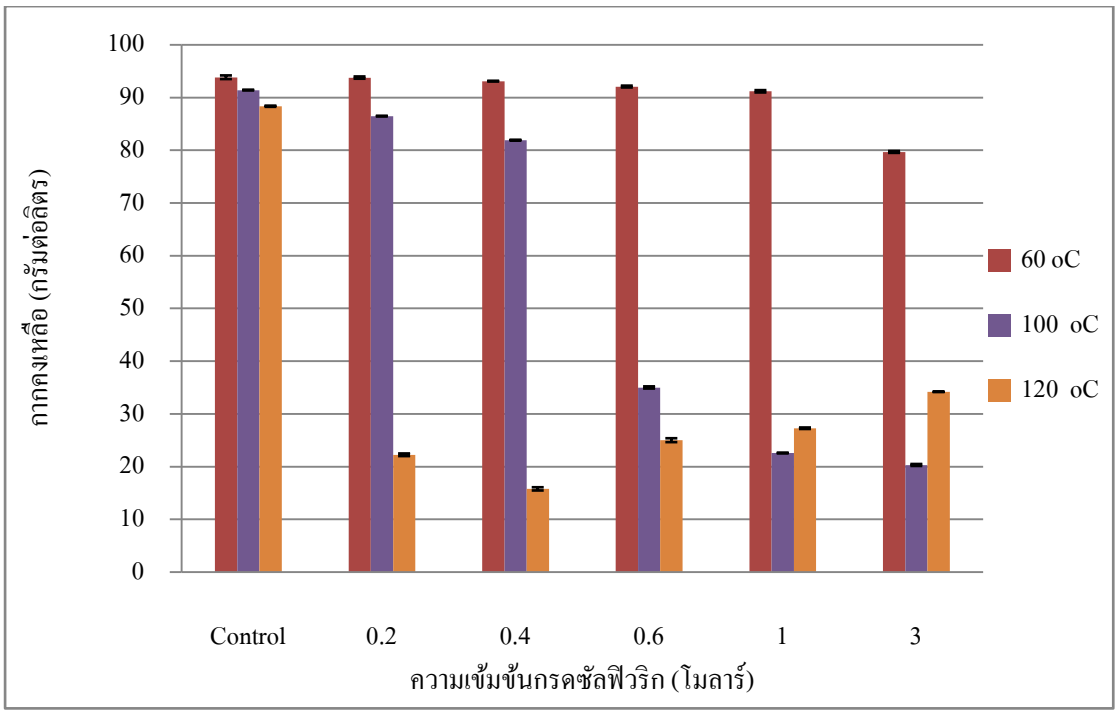
5 .1 การศึกษาการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดซัลฟิวริก

จากการทดลองย่อยกากมันสำปะหลังที่ความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร โดยทดลองที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 100 และ 120 องศาเซลเซียส ในหม้อนึ่งความดันไอสูง เป็นเวลา 30 นาที และใช้กรดซัลฟิวริกที่ความเข้มข้น 0 – 3.0 โมลาร์ พบว่าสามารถย่อยกากมันสำปะหลังให้เป็นน้ำตาลกลูโคสได้ โดยการย่อย

กากมันสำปะหลังด้วยกรดซัลฟิวริกที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสนั้น สามารถผลิตน้ำตาลกลูโคสได้ในปริมาณที่ต่ำ เนื่องจากการย่อยใช้อุณหภูมิที่ต่ำ ทำให้มีความร้อนไม่เพียงพอในการช่วยย่อยกากมันสำปะหลังร่วมกับกรด ในขณะที่การย่อยกากมันสำปะหลังที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียสด้วยกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 0.4 โมลาร์ สามารถผลิตน้ำตาลกลูโคสได้สูงที่สุดคือ 79.17 กรัมต่อลิตร และมีปริมาณกากคงเหลือเท่ากับ 15.77 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 4-35, 4-36)



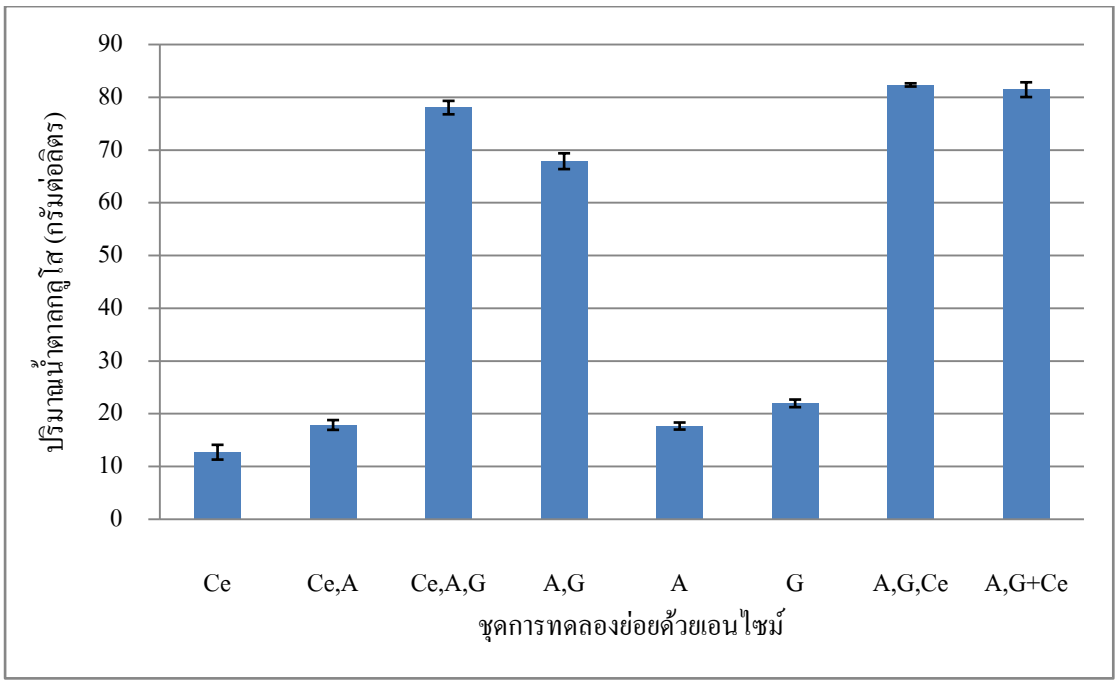
ภาพที่ 4-35 ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดซัลฟิวริกที่ความเข้มข้นแตกต่างกันในสภาวะอุณหภูมิแตกต่างกัน



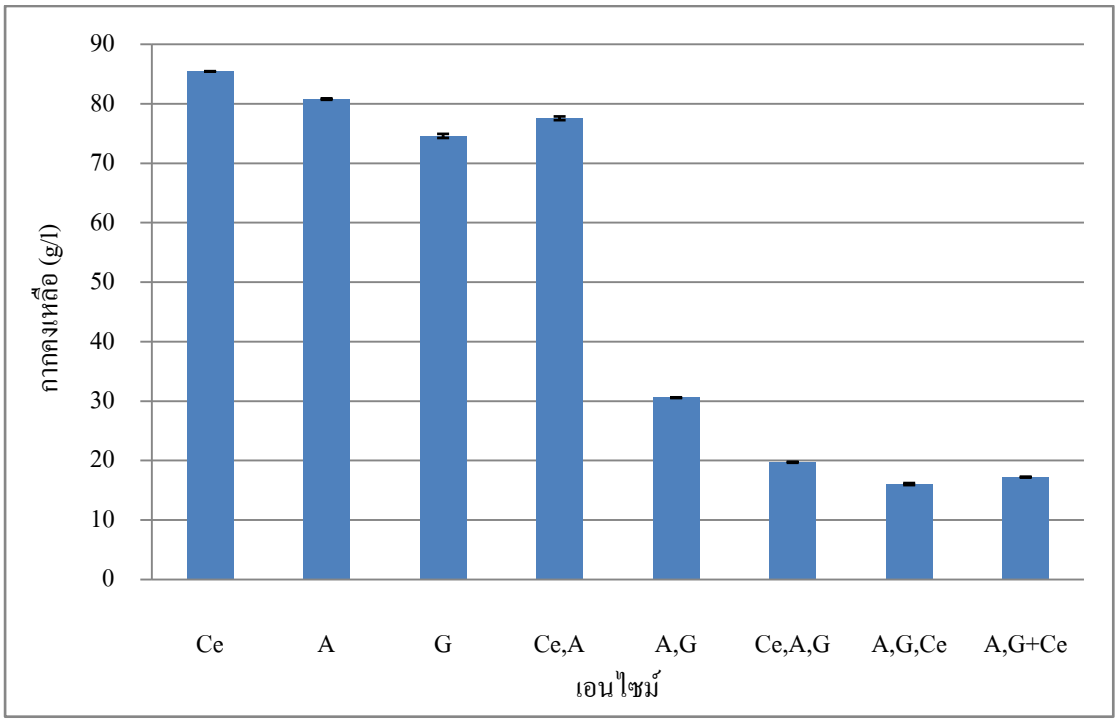
ภาพที่ 4-36 ปริมาณกากคงเหลือจากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดซัลฟิวริก

5.2 การศึกษาการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์

จากการทดลองย่อยกากมันสำปะหลังที่ความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร โดยใช้เอนไซม์ที่แตกต่างกันคือ เอนไซม์เซลลูเลส แอลฟาอะไมเลส และกลูโคอะไมเลส พบว่าการใช้เอนไซม์เซลลูเลสเพียงชนิดเดียวในการย่อยกากมันสำปะหลังสามารถผลิตน้ำตาลกลูโคสได้ในปริมาณที่ต่ำ ซึ่งได้ผลเหมือนกันกับการใช้เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส หรือกลูโคอะไมเลสเพียงชนิดเดียวในการย่อย เมื่อใช้เอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดในการย่อยกากมันสำปะหลังพบว่า สามารถผลิตน้ำตาลกลูโคสได้ปริมาณสูง โดยการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส กลูโคอะไมเลสและเซลลูเลส ตามลำดับ สามารถผลิตน้ำตาลกลูโคสได้ปริมาณสูงที่สุดคือ 82.37 กรัมต่อลิตร และมีปริมาณกากคงเหลือเท่ากับ 16.07 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 4-37, 4-38)



ภาพที่ 4-37 ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์ที่แตกต่างกัน
(Ce : เซลลูเลส, A : แอลฟาอะไมเลส, G : กลูโคอะไมเลส)



ภาพที่ 4-38 ปริมาณกากคงเหลือจากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์

จากการทดลองย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดและเอนไซม์ โดยใช้กากมันสำปะหลังเข้มข้นร้อยละ 10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (10 กรัมในน้ำ 100 มิลลิลิตร) ที่ทดลองในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร พบว่า การใช้กรดซัลฟิวริกเข้มข้น 0.4 โมลาร์ ในการย่อยกากมันสำปะหลังที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส สามารถผลิตน้ำตาลกลูโคสได้สูงสุด (79.17 กรัมต่อลิตร) ในขณะที่การย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส กลูโคอะไมเลสและเซลลูเลส ตามลำดับ สามารถผลิตน้ำตาลกลูโคสได้สูงสุด (82.37 กรัมต่อลิตร)

เมื่อได้สภาวะการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดและเอนไซม์ที่สามารถผลิตน้ำตาลกลูโคสได้สูงที่สุดแล้วจึงนำมาศึกษาต้นทุนที่เกิดขึ้นในกระบวนการย่อย โดยแบ่งเป็นต้นทุนจาก 1. ค่าสารเคมีหรือเอนไซม์ 2. ความสิ้นเปลืองพลังงาน ผลการวิเคราะห์พบว่าการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดมีต้นทุนค่าสารเคมี 0.44 บาท และมีความสิ้นเปลืองพลังงาน 1.5 กิโลวัตต์-ชั่วโมง (ตารางที่ 4-6) ซึ่งมีต้นทุนที่ต่ำกว่าการย่อยด้วยเอนไซม์ แต่มีข้อเสียคือ น้ำตาลที่ได้จากการย่อยด้วยกรดมีความบริสุทธิ์ต่ำกว่าการย่อยด้วยเอนไซม์ มีค่าความเป็นกรดสูงซึ่งเมื่อจะนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในกระบวนการหมักจะต้องสิ้นเปลืองสารเคมีในการปรับค่าความเป็นกรดด่างจำนวนมาก อีกทั้งเครื่องมือและอุปกรณ์ยังไม่เอื้ออำนวยให้สามารถผลิตในปริมาณสูง ๆ ได้ ผู้วิจัยจึงเลือกวิธีการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์ซึ่งเหมาะสมสำหรับการวิจัยในครั้งนี้

ตารางที่ 4-6 ต้นทุนในกระบวนการย่อยกากมันสำปะหลัง

การย่อยกากมันสำปะหลัง (10 %w/v) ด้วยกรด	**ต้นทุน**
- กรดซัลฟิวริก[1]	0.44 บาท
- ความสิ้นเปลืองพลังงาน[2] (เวลา 30 นาที)	1.5 กิโลวัตต์-ชั่วโมง
การย่อยกากมันสำปะหลัง (10 %w/v) ด้วยเอนไซม์	
- เอนไซม์ (เซลลูเลส, แอลฟาอะไมเลส, กลูโคอะไมเลส)[3]	7.31 บาท
- ความสิ้นเปลืองพลังงาน[4] (เวลา 47 ชั่วโมง)	84.6 กิโลวัตต์-ชั่วโมง

"หมายเหตุ" (1) กรดซัลฟิวริก 0.4 โมลาร์ (กรดซัลฟิวริกเข้มข้น 18 M ราคา 200 บาท/ลิตร)

(2) หม้อนึ่งความดันไอสูง (Auto clave) Model : WACS-1060 Korea, 230 V., 3000 W.

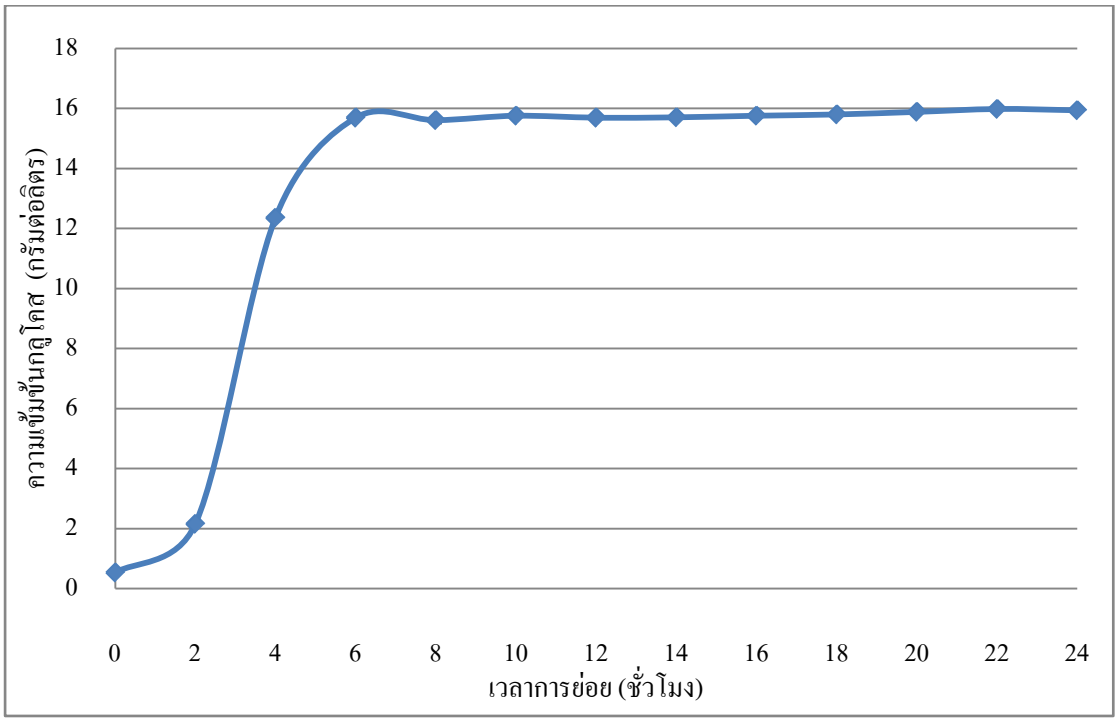
(3) เซลลูเลส Biocelle Fuel ราคา 4,870 บาท/ 50 มิลลิลิตร, แอลฟาอะไมเลส GC358 ราคา 195 บาทต่อกิโลกรัม, กลูโคอะไมเลส GC147 ราคา 190 บาทต่อกิโลกรัม

(4) อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) Memmert WNB14 Germany, 230 V., 1800 W.

5.3 การศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์

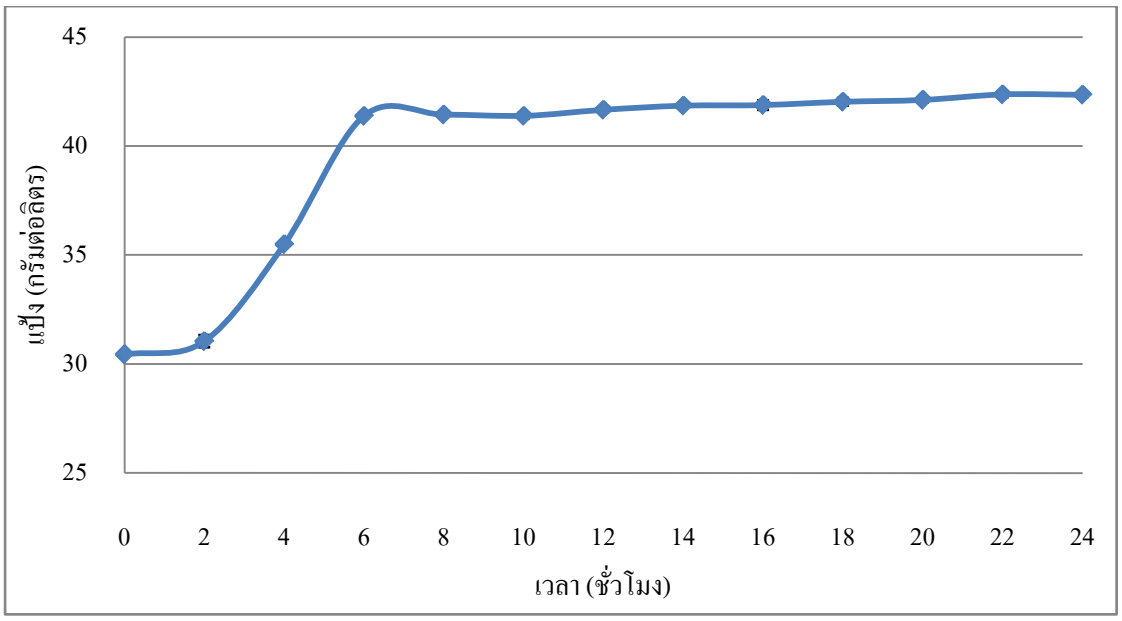
5.3.1 การศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์เซลลูเลส

จากการทดลองพบว่าปริมาณน้ำตาลกลูโคสเพิ่มสูงขึ้นตามระยะเวลาในการย่อย โดยน้ำตาลกลูโคสเพิ่มสูงขึ้นมากในช่วงเวลา 2 ถึง 6 ชั่วโมง และตั้งแต่เวลา 6 ชั่วโมงจนถึงชั่วโมงที่ 24 มีระดับน้ำตาลกลูโคสไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ดังนั้นการย่อยกากมันสำปะหลังเป็นเวลา 6 ชั่วโมง เป็นระยะเวลาที่สั้นและเหมาะสมที่สุด โดยสามารถผลิตน้ำตาลได้เท่ากับ 15.69 กรัมต่อลิตร



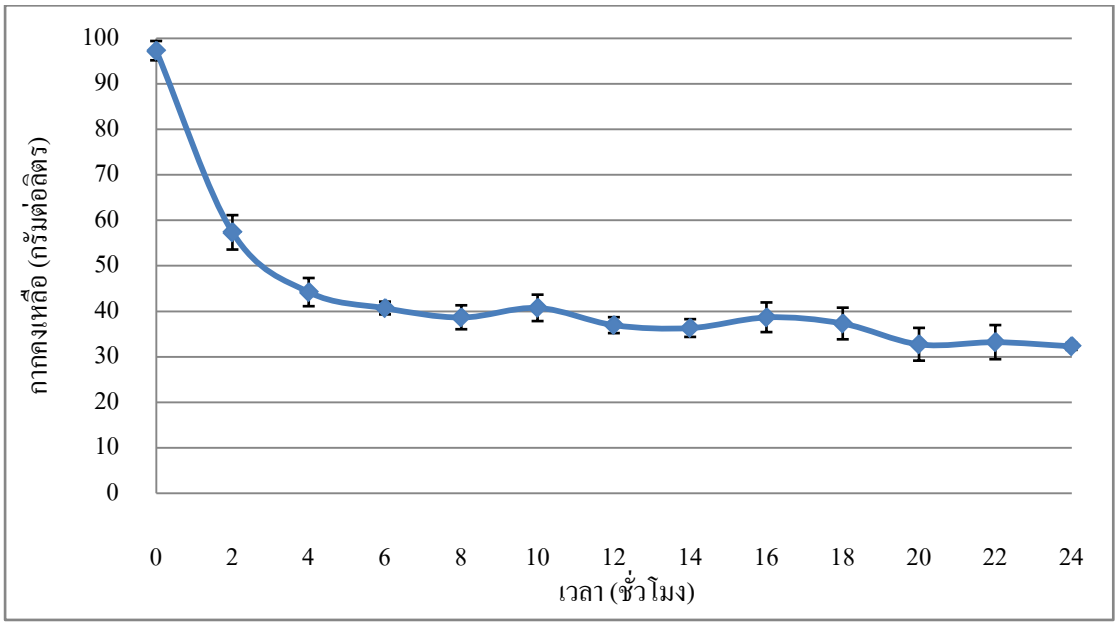
ภาพที่ 4-39 ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์เซลลูเลส

จากการทดลองพบว่าแป้งมีปริมาณเพิ่มสูงขึ้นเรื่อย ๆ ตามระยะเวลาที่นานขึ้น โดยที่เวลา 0 ชั่วโมง มีปริมาณแป้งเท่ากับ 30.43 กรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นปริมาณแป้งในกากมันสำปะหลังที่เหลือจากกระบวนการสกัดแป้ง ปริมาณแป้งเพิ่มสูงขึ้นมากจากการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสที่ย่อยโครงสร้างพวกเซลลูโลสในกากมันสำปะหลังให้เปิดออก ทำให้เม็ดแป้งแตกออกมา จึงมีปริมาณเพิ่มสูงขึ้นจนถึงที่เวลา 6 ชั่วโมง ซึ่งเท่ากับ 41.38 กรัมต่อลิตร และหลังจากชั่วโมงที่ 6 พบว่าปริมาณแป้งมีระดับคงที่และ มีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับปริมาณแป้งในชั่วโมงที่ 8

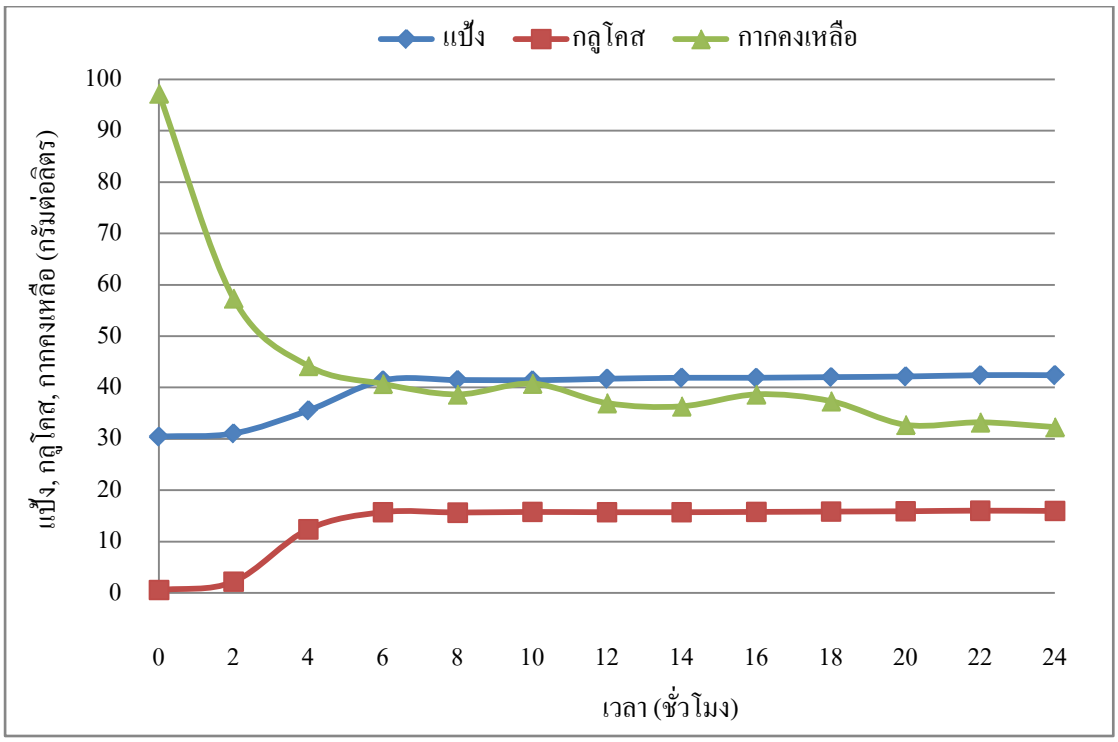


ภาพที่ 4-40 แป้งที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์เซลลูเลส

จากผลการทดลองพบว่าการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์เซลลูเลสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีปริมาณกากคงเหลือลดลงเรื่อย ๆ ซึ่งเป็นผลจากการถูกย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส



ภาพที่ 4-41 ปริมาณกากคงเหลือที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์เซลลูเลส



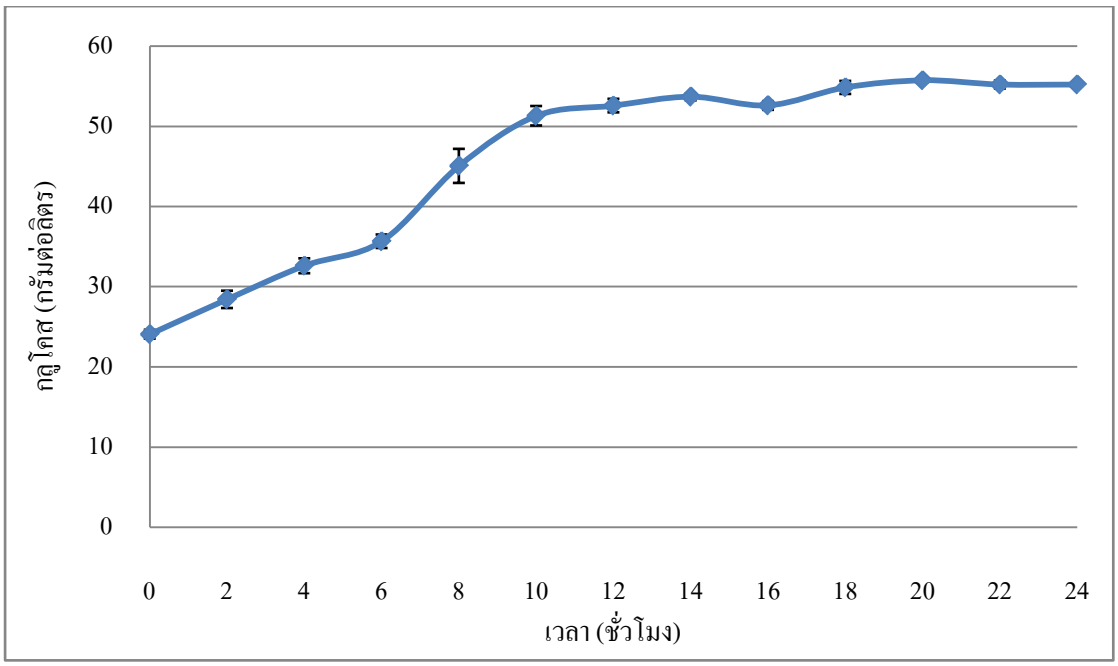
ภาพที่ 4-42 ปริมาณน้ำตาลกลูโคส ปริมาณแป้ง และกากคงเหลือที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์เซลลูเลส

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าระยะเวลาในการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์เซลลูเลสที่เหมาะสมคือ ที่เวลา 6 ชั่วโมง เนื่องจากเป็นระยะเวลาที่มีปริมาณน้ำตาลกลูโคสอยู่ในปริมาณมากและใช้เวลาน้อยในการย่อยและหลังจากเวลานี้มีระดับน้ำตาลกลูโคสคงที่ ในขณะปริมาณแป้งก็เพิ่มสูงขึ้นไปจนถึงที่เวลา 6 ชั่วโมง หลังจากนั้นจะมีระดับคงที่

5.3.2 การศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์กลูโคอะไมเลส

1. ปริมาณน้ำตาลกลูโคส

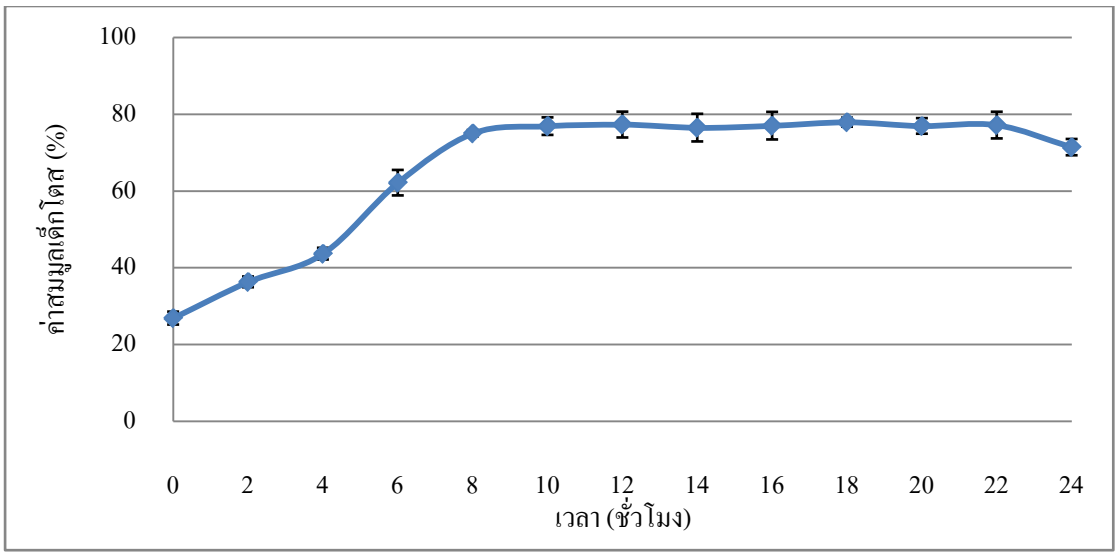
จากผลการทดลองพบว่าปริมาณน้ำตาลกลูโคสเพิ่มสูงขึ้นมากจากชั่วโมงที่ 0 จนถึงชั่วโมงที่ 10 โดยมีปริมาณน้ำตาลกลูโคสเท่ากับ 51.3 กรัมต่อลิตร และหลังจากชั่วโมงที่ 10 พบว่าปริมาณน้ำตาลกลูโคสมีระดับคงที่และมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) กับชั่วโมงที่ 12



ภาพที่ 4-43 ปริมาณน้ำตาลกลูโคสจากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์กลูโคอะไมเลส

2. ค่าสมมูลเด็กโตส หรือ ค่า DE

จากผลการทดลองพบว่า ค่า DE แปรผันตามปริมาณน้ำตาลกลูโคส โดยมีค่าเพิ่มสูงขึ้นเรื่อย ๆ ตามระยะเวลาที่นานขึ้น ซึ่งเพิ่มสูงขึ้นไปถึงที่เวลา 10 ชั่วโมง และมีระดับคงที่ค่อนข้างคงที่



ภาพที่ 4-44 ค่า DE (%) จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์กลูโคอะไมเลส

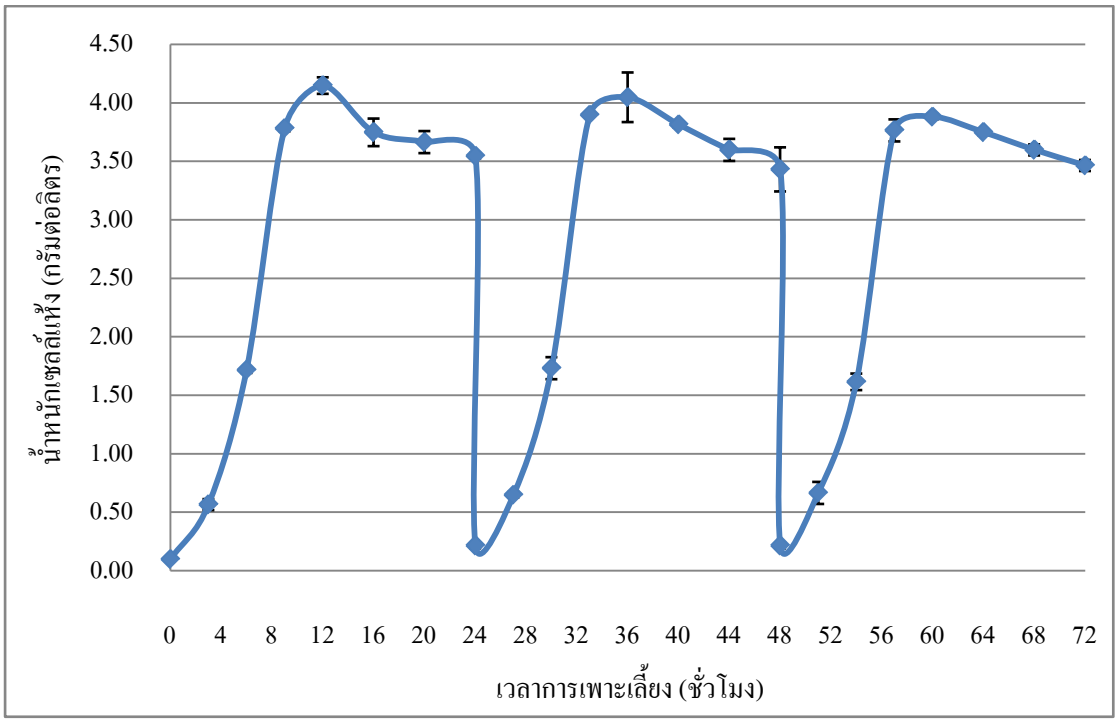
จากผลการทดลองการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์กลูโคอะไมเลสหลังจากผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสและแอลฟาอะไมเลสแล้ว พบว่าระยะเวลาที่เหมาะสมซึ่งเป็นเวลาที่สั้นที่สุดและสามารถผลิตน้ำตาลกลูโคสได้สูงคือ ที่เวลา 10 ชั่วโมง ซึ่งมีน้ำตาลกลูโคสเท่ากับ 51.3 กรัมต่อลิตร และมีค่า DE ร้อยละ 83.55

5.4 การผลิตกรดซัคซินิคจากกากมันสำปะหลัง

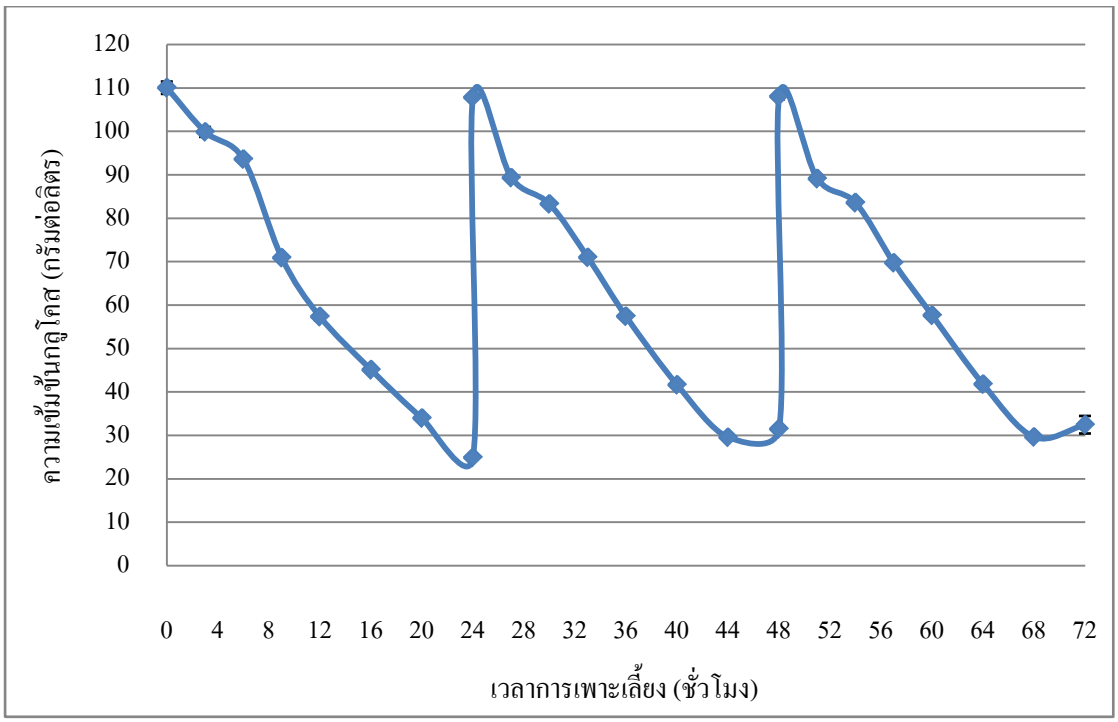
การศึกษาการผลิตกรดซัคซินิคจากกากมันสำปะหลังเป็นการทดลองเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่สามารถคัดแยกได้จากกระเพาะกระบือโดยใช้แหล่งคาร์บอนในกระบวนการหมักจากน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์ในสภาวะที่ให้ผลการทดลองที่เหมาะสมที่สุด ในสภาวะการผลิตกรดซัคซินิคจะเพาะเลี้ยงแบบหลายกะลำดับต่อเนื่อง โดยใช้สภาวะเช่นเดียวกับการผลิตจากน้ำตาลที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง โดยทำการเพาะเลี้ยงแบบกะครั้งที่ 1 เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการถ่ายน้ำหมักออก เหลือไว้เพียง 200 มิลลิลิตร (คิดเป็นร้อยละ 5 โดยปริมาตรต่อปริมาตรของ 4 ลิตร) เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อเริ่มต้นของการเพาะเลี้ยงแบบกะครั้งต่อไป จากนั้นเติมอาหารชุดใหม่ที่ส่วนประกอบและความเข้มข้นเท่าเดิม ปริมาตร 3,800 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงตามปกติ เมื่อครบตามระยะเวลาการเพาะเลี้ยงที่กำหนดจึงทำซ้ำอีก 1 ครั้ง (รวมทั้งสิ้น 3 ครั้ง)

จากผลการทดลอง (ภาพที่ 4-45) แสดงให้เห็นว่าในการเพาะเลี้ยงครั้งที่ 1 แบคทีเรียมีการเจริญได้อย่างรวดเร็วตั้งแต่เวลา 0 – 12 ชั่วโมง มีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงที่สุดเท่ากับ 3.55 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 24 ชั่วโมง มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 110.08 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 4-46) และลดลงเรื่อย ๆ จนต่ำสุดเท่ากับ 24.89 กรัมต่อลิตร จากกราฟจะสังเกตได้ว่า กรดซัคซินิคมีปริมาณเพิ่มสูงขึ้นเรื่อย ๆ และสูงที่สุดที่เวลา 24 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 37.92 กรัมต่อลิตร มีกรดแลกติกและกรดอะซิติกเท่ากับ 12.84 และ 20.13 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (ภาพที่ 4-47) (สิ้นสุดการเพาะเลี้ยงครั้งที่ 1) หลังจากนั้นเมื่อทำการเปลี่ยนอาหารเพื่อเข้าสู่การเพาะเลี้ยงแบบกะ ครั้งที่ 2 พบว่า เซลล์มีการเจริญเป็นแนวโน้มเดียวกันกับการเพาะเลี้ยงครั้งที่ 1 โดยมีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 4.05 กรัมต่อลิตรที่เวลา 12 ชั่วโมง ปริมาณน้ำตาลลดลงอย่างรวดเร็วและมีค่าต่ำสุดที่เวลา 24 ชั่วโมง เท่ากับ 31.43 กรัมต่อลิตร และการเพาะเลี้ยงครั้งที่ 2 สามารถผลิตกรดซัคซินิคได้สูงสุดเท่ากับ 43.38 กรัมต่อลิตร ผลิตกรดแลกติกและกรดอะซิติกได้ 13.74 และ 21.47 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (สิ้นสุดการเพาะเลี้ยงครั้งที่ 2) หลังจากนั้นเมื่อทำการเปลี่ยนอาหารเพื่อเข้าสู่การเพาะเลี้ยงแบบกะ ครั้งที่ 3 พบว่าผลการทดลองที่ได้มีความคล้ายคลึงกับผลการเพาะเลี้ยงครั้งที่ 2 โดยน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 3.88 กรัมต่อลิตร มีปริมาณน้ำตาลคงเหลือต่ำสุดเท่ากับ 32.45 กรัมต่อลิตร และสามารถผลิตกรดซัคซินิค

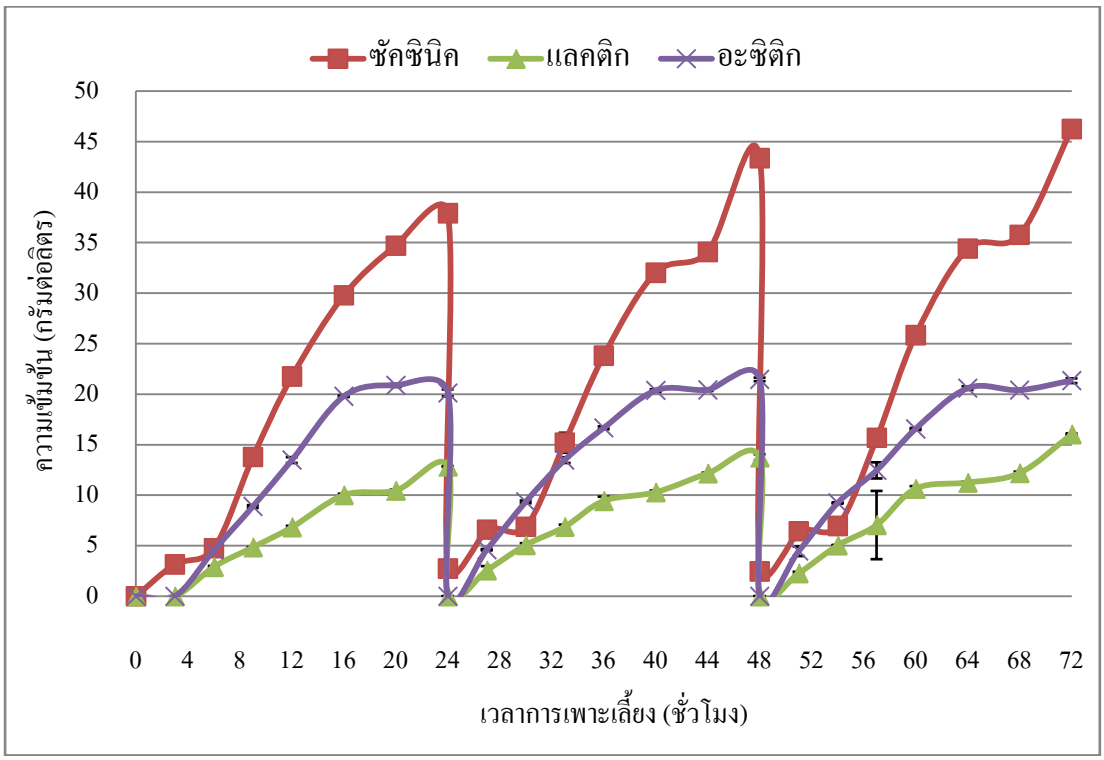
ได้สูงสุดที่เวลา 24 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 46.26 กรัมต่อลิตร ผลิตกรดแลกติกและกรดอะซิติกได้เท่ากับ 16.03 และ 21.34 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ



ภาพที่ 4-45 น้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้จากการผลิตกรดซัคซินิคจากกากมันสำปะหลัง



ภาพที่ 4-46 ปริมาณการใช้น้ำตาลที่ได้จากการผลิตกรดซัคซินิคจากกากมันสำปะหลัง



ภาพที่ 4-47 ผลิตภัณฑ์กรดอินทรีย์ที่ได้จากการผลิตกรดซัคซินิคจากกากมันสำปะหลัง

จากตารางที่ 4-6 จะเห็นได้ว่าการเพาะเลี้ยงกะที่ 1 สามารถผลิตกรดซัคซินิคได้เท่ากับ 37.93 กรัมต่อลิตร มีผลผลิตกรดซัคซินิคต่อน้ำตาลที่ใช้ไปเท่ากับ 0.45 กรัมต่อกรัม และมีอัตราการผลิตเท่ากับ 1.580 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ซึ่งมีความแตกต่างกันกับการเพาะเลี้ยงในกะที่ 2 และ 3 ที่สามารถผลิตกรดซัคซินิคได้สูงกว่าเท่ากับ 43.38 และ 46.27 กรัมต่อลิตร มีผลผลิตต่อน้ำตาลที่ใช้ไปเท่ากับ 0.57 และ 0.61 กรัมต่อกรัม และมีอัตราการผลิตเท่ากับ 1.808 และ 1.928 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ

ตารางที่ 4-7 การผลิตกรดซัคซินิคจากน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยแบคทีเรียหมายเลข 37 โดย การเพาะเลี้ยงแบบหลายกะลำดับต่อเนื่อง

Fermentation	**Initial glucose (g/L)**	**Residual glucose (g/L)**	**Succinic (g/L)**	**Succinic Yield (g/ g)**	**Efficiency (%)**	**Productivity (g/L/h)**
Multiple sequential batch (I)	110.09	24.89	37.93±0.32 [a]	0.45±0 [a]	66.44±0.56 [a]	1.58±0.01 [a]
Multiple sequential batch (II)	107.89	31.43	43.38±0.34 [b]	0.57±0 [b]	84.68±0.66 [b]	1.81±0.01 [b]
Multiple sequential batch (III)	108.1	32.45	46.27±0.16 [c]	0.61±0 [c]	91.28±0.32 [c]	1.92±0.01 [c]

"หมายเหตุ" Multiple sequential batch (I), (II), (III) คือ การเพาะเลี้ยงแบบหลายกะลำดับต่อเนื่องกะที่ 1, 2, 3

Initial glucose คือ ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)

Residual glucose คือ ปริมาณน้ำตาลคงเหลือ (กรัมต่อลิตร)

Succinic Yield คือ ผลผลิตกรดซัคซินิคต่อน้ำตาลที่ใช้ไป (กรัมต่อกรัม)

Efficiency คือ ประสิทธิภาพการผลิต (%)

Productivity คือ อัตราการผลิตกรดซัคซินิค (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)

บทที่ 5

อภิปรายและสรุปผล

อภิปรายผล

1. การศึกษาการคัดแยกแบคทีเรียจากกระเพาะกระบือที่สามารถผลิตกรดซัคซินิคได้

การผลิตกรดซัคซินิคทางชีวภาพ สามารถผลิตโดยอาศัยกระบวนการหมักแบบไร้ออกซิเจนของแบคทีเรียที่สามารถคัดแยกได้จากธรรมชาติ เช่น จากกระเพาะของสัตว์เคี้ยวเอื้องเป็นส่วนใหญ่ โดยงานวิจัยนี้ได้คัดแยกแบคทีเรียจากกระเพาะของกระบือ โดยการเก็บตัวอย่างของเหลวในกระเพาะหมักหรือกระเพาะส่วนรูเมนมาทำเพาะเลี้ยงในสภาวะไร้ออกซิเจน จากการทดลองพบว่า มีแบคทีเรียทั้งหมด 46 ไอโซเลตที่สามารถเจริญในสภาวะไร้ออกซิเจนและมีแบคทีเรียเพียง 30 ไอโซเลตที่สามารถเจริญและเปลี่ยนสีของอาหาร Screening agar จากสีเขียวเป็นสีเหลือง ซึ่งแสดงว่า มีความสามารถในการผลิตกรดอินทรีย์ได้ ดังนั้นสามารถคัดแยกแบคทีเรียได้จำนวน 30 ไอโซเลตเพื่อนำทดสอบการผลิตกรดซัคซินิค

การทดสอบการผลิตกรดซัคซินิคของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ เริ่มต้นจากการทดสอบในขวดทดลองขนาด 50 มิลลิลิตร โดยทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะไร้ออกซิเจน ผลการทดลองพบว่าสามารถคัดแยกแบคทีเรียได้จำนวน 4 ไอโซเลต จากจำนวนทั้งสิ้น 46 ไอโซเลต คือแบคทีเรียหมายเลข 12, 28, 35 และ 37 ที่สามารถผลิตกรดซัคซินิคได้ในปริมาณสูง (1.39, 1.32, 1.33 และ 1.36 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ) จากนั้นจึงนำมาทดสอบในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร โดยทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะไร้ออกซิเจนเช่นเดียวกัน ทั้งนี้แบคทีเรียต่างชนิดกันมีความสามารถในการผลิตกรดซัคซินิคได้ต่างกัน โดยผลการทดลองพบว่าแบคทีเรียหมายเลข 37 สามารถผลิตกรดซัคซินิคได้สูงที่สุดและหมายเลข 35, 28 และ 12 สามารถผลิตได้เป็นลำดับรองลงมา (2.88, 1.91, 1.45 และ 1.24 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ) เมื่อจำแนกชนิดของแบคทีเรียหมายเลข 37 พบว่าเป็น *Enterobacter xiangfangensis* ซึ่งจัดเป็นแบคทีเรียชนิดใหม่ที่สามารถผลิตกรดซัคซินิคได้ ซึ่งยังไม่พบรายงานการวิจัยที่ใช้แบคทีเรียชนิดนี้ในการผลิตกรดซัคซินิค ดังนั้นจึงเลือกแบคทีเรียหมายเลข 37 มาทำการศึกษาวิจัยในลำดับถัดไป

2. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดซัคซินิคของแบคทีเรียที่คัดแยกได้

สภาวะที่เหมาะสมในกระบวนการหมัก เช่น อัตราการเจริญ แหล่งไนโตรเจน แหล่งคาร์บอน แหล่งแร่ธาตุ และอื่น ๆ เป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งเสริมให้สามารถผลิตกรดซัคซินิคได้ในปริมาณสูง การผลิตกรดอินทรีย์อื่น ๆ ที่เป็นผลพลอยได้ (By-products) เช่น กรดแลกติก กรดอะซิติก ให้มีผลผลิตได้ในปริมาณที่ต่ำ จึงจำเป็นต้องศึกษาหาอัตราการเจริญของแบคทีเรียหมายเลข 37 ผลการทดลองปรากฏว่าแบคทีเรียหมายเลข 37 สามารถเจริญได้ดีและเจริญอย่างรวดเร็วตั้งแต่เริ่มต้นจนถึงเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นจนถึงสิ้นสุดการทดลองมีแนวโน้มคงที่ โดยที่เวลา 24 ชั่วโมง สามารถผลิตกรดซัคซินิคได้ 6.74 กรัมต่อลิตร และหลังจากชั่วโมงที่ 24 เป็นต้นไป พบว่าความเข้มข้นของกรดซัคซินิคไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<.05) (ภาคผนวก ค) ในขณะที่กรดแลกติกและกรดอะซิติกมีปริมาณเพิ่มสูงขึ้น ซึ่งเป็นผลจากสภาวะไร้ออกซิเจนของการเพาะเลี้ยงที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ไม่เพียงพอ ดังนั้นระยะเวลาที่เหมาะสมในการหมักคือ 24 ชั่วโมง เนื่องจากสามารถผลิตกรดซัคซินิคได้สูงและเมื่อระยะเวลาการหมักเพิ่มขึ้นก็ไม่ส่งผลให้ความเข้มข้นของกรดซัคซินิคเพิ่มสูงขึ้นด้วย

การศึกษาหาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดซัคซินิคด้วยแบคทีเรียหมายเลข 37 พบว่าการใช้ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนที่มีประสิทธิภาพ สามารถผลิตกรดซัคซินิคได้สูงที่สุด คือ 5.01 กรัมต่อลิตร สอดคล้องกับงานวิจัยของ Liu et al. (2008) ที่ผลิตกรดซัคซินิคด้วย *A. succinogenes* CGMCC1593 ซึ่งพบว่า ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนที่สามารถผลิตกรดซัคซินิคได้สูงที่สุด ซึ่งเป็นผลมาจากยีสต์สกัดอุดมไปด้วยสารอาหาร โปรตีน แร่ธาตุ วิตามินและองค์ประกอบอื่น ๆ ที่ส่งเสริมให้แบคทีเรียหมายเลข 37 สามารถเจริญได้ดีและผลิตกรดซัคซินิคได้ปริมาณสูงที่สุดเมื่อเทียบกับแหล่งไนโตรเจนอื่น ๆ ทั้งชนิดที่เป็นสารอินทรีย์และอนินทรีย์ในการทดลอง และแหล่งไนโตรเจนที่สามารถผลิตกรดซัคซินิคได้ในลำดับรองลงมาคือ ทริปโตน มอต์ลสกัด แอมโมเนียมคลอไรด์ แอมโมเนียมฟอสเฟต แอมโมเนียมซัลเฟต ตามลำดับ

เมื่อเปรียบเทียบผลการทดลองระหว่างการผลิตกรดซัคซินิคของเชื้อมาตรฐาน (*A. succinogenes* ATCC55618) กับแบคทีเรียหมายเลข 37 ที่คัดแยกได้นั้น พบว่าเชื้อมาตรฐานสามารถผลิตกรดซัคซินิคได้สูงกว่าแบคทีเรียหมายเลข 37 คือ 6.98 และ 5.01 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และผลิตกรดแลกติกและกรดอะซิติก ได้ 1.09 และ 1.05 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งเป็นปริมาณที่

น้อยเมื่อเทียบกับแบคทีเรียหมายเลข 37 ที่ผลิตได้ 2.85 และ 0.99 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียที่คัดแยกได้นั้นสามารถผลิตกรดอินทรีย์ได้หลากหลาย ในปริมาณที่แตกต่างกัน ขณะที่เชื้อมาตรฐานได้ผ่านการพัฒนาปรับปรุงสายพันธุ์ให้สามารถผลิตกรดซัคซินิคได้สูงกว่ากรดอินทรีย์อื่น ๆ

แหล่งคาร์บอนนับเป็นปัจจัยสำคัญสำหรับกระบวนการผลิตกรดซัคซินิค นอกจากจะเป็นแหล่งอาหารของแบคทีเรียในการผลิตแล้วยังจัดเป็นต้นทุนที่สำคัญอีกด้วย โดยการทดลองการผลิตกรดซัคซินิคด้วยแบคทีเรียหมายเลข 37 โดยใช้แหล่งคาร์บอนคือ กลูโคสแบบผงสำหรับงานวิจัย กลีเซอรอลสำหรับงานวิจัย (Anestis et al., 2011; Sasithorn & Tawiwan, 2015) และน้ำตาลที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง ผลการทดลองข้างต้นให้ผลสอดคล้องกับรายงานการวิจัยของ Isar et al. (2006) ที่พบว่า น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ทำให้สามารถผลิตกรดซัคซินิคได้สูงกว่าการใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน ในขณะที่การใช้น้ำตาลจากการย่อยแป้งมันสำปะหลังสามารถผลิตกรดซัคซินิคได้สูงที่สุดเมื่อเทียบกับแหล่งคาร์บอนอื่น ๆ ในการทดลอง เนื่องจากน้ำตาลจากการย่อยแป้งมันสำปะหลังประกอบไปด้วยกลูโคสเป็นส่วนใหญ่และยังมีสารอาหาร เช่น โปรตีน วิตามิน แร่ธาตุอื่น ๆ คงเหลือจากกระบวนการย่อยแป้งมันสำปะหลัง จึงส่งผลให้แบคทีเรียมีการเจริญดีและสามารถผลิตกรดซัคซินิคได้สูง

ในระหว่างกระบวนการหมักจะเกิดผลิตภัณฑ์กรดอินทรีย์เป็นปริมาณที่เพิ่มสูงขึ้น ส่งผลให้ค่าความเป็นกรดด่างลดลง จึงจำเป็นต้องใช้แหล่งคาร์บอเนตในกระบวนการหมักด้วยเพื่อควบคุมค่าความเป็นกรดด่างให้อยู่ในระดับที่เหมาะสม อีกทั้งคาร์บอเนตยังสามารถแตกตัวให้คาร์บอนไดออกไซด์ซึ่งจะส่งผลให้สามารถผลิตกรดซัคซินิคได้ในปริมาณสูงและเกิดผลิตภัณฑ์กรดอินทรีย์อื่น ๆ ที่ไม่ต้องการในปริมาณน้อย ผลการทดลองปรากฏว่าสามารถผลิตกรดซัคซินิคได้สูงสุด มาจนต่ำสุด จากการใช้แหล่งคาร์เนตคือ แมกนีเซียมคาร์บอเนต โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต โซเดียมคาร์บอเนต และแมกนีเซียมไดไฮโดรเจนคาร์บอเนต ตามลำดับ ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกับงานวิจัยของ Li et al. (2011) ที่ใช้แมกนีเซียมคาร์บอเนตในการหมัก สามารถผลิตกรดซัคซินิคได้สูงสุด ซึ่งพบว่า แมกนีเซียมคาร์บอเนตนอกจากจะทำหน้าที่ในการควบคุมระดับ

ค่าความเป็นกรดด่างและแตกตัวให้คาร์บอนไดออกไซด์แล้ว แมกนีเซียมยังเป็นปัจจัยร่วม (Cofactor) สำหรับ PEP carboxykinase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สำคัญที่ใช้ในการสังเคราะห์กรดซัคซินิคของแบคทีเรีย (Bazaes et al., 2007)

3. การศึกษาการผลิตกรดซัคซินิคแบบกะ (Batch) ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

การศึกษาการผลิตกรดซัคซินิคแบบกะในถังหมักเพื่อขยายขนาดการผลิต โดยให้สามารถควบคุมสภาวะการหมักที่เหมาะสมได้ โดยทำการทดลองที่แตกต่างกัน 4 ถังหมัก ผลการทดลองในตารางที่ 4-4 ปรากฏว่าแบคทีเรียหมายเลข 37 สามารถใช้น้ำตาลเริ่มต้นในระดับปานกลาง (63.89 กรัมต่อลิตร) ได้ดี โดยมีผลผลิตกรดซัคซินิคต่อน้ำตาลที่ใช้ไปเท่ากับ 0.66 กรัมต่อกรัม (ถังหมัก 1) และเมื่อทดลองปรับเพิ่มความเข้มข้นของปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น ความเข้มข้นองค์ประกอบของอาหาร และการกวนผสม พบว่าสามารถผลิตกรดซัคซินิคได้สูงขึ้นเท่ากับ 53.66 กรัมต่อลิตร เนื่องจากแบคทีเรียมีอาหารและปัจจัยในการเจริญมากขึ้น จึงส่งผลให้สามารถผลิตกรดซัคซินิคได้สูงขึ้น อีกทั้งการเพิ่มอัตราการกวนผสมทำให้ใบกวนหมุนตีฟองก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ให้แตกเป็นฟองขนาดเล็กซึ่งแบคทีเรียสามารถนำมาใช้ได้ดีขึ้น และยังทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อเกิดการกวนผสมได้มากขึ้น ส่งผลให้แบคทีเรียได้รับสารอาหารได้ดีขึ้นในระหว่างกระบวนการหมักซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Isar et al. (2006) นอกจากนี้ยังมีรายงานของ Moon and Parulekar (1991); Hameed et al. (1999) ที่พบว่าอัตราการกวนผสมเป็นปัจจัยสำคัญในระหว่างกระบวนการหมัก เมื่อพิจารณาจากผลผลิตกรดซัคซินิคต่อน้ำตาลที่ใช้ไปแล้วพบว่าแบคทีเรียสามารถเปลี่ยนน้ำตาลเป็นกรดซัคซินิคได้ไม่สูงเท่าที่ควร (0.55 กรัมต่อกรัม) (ถังหมัก 2) จึงนำมาสู่การทดลองเพิ่มความเข้มข้นองค์ประกอบของอาหาร และปรับอัตราการกวนผสมให้สูงขึ้น เพื่อต้องการให้เกิดอัตราการผลิตกรดซัคซินิคที่เพิ่มสูงขึ้น (ถังหมัก 3) ปรากฏว่า อัตราการผลิตกรดซัคซินิคต่อน้ำตาลที่ใช้ไปเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย (0.58 กรัมต่อกรัม) ทั้งนี้เป็นผลจากความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นที่มีปริมาณสูง ซึ่งตรงกับรายงานของ Urbance et al. (2004) ที่พบว่ากรดซัคซินิคที่ได้ลดลงเมื่อใช้ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นสูงกว่า 60 กรัมต่อลิตร ในการหมักด้วย *A. succinogenes*. ขณะที่ประสิทธิภาพการผลิตเพิ่มสูงขึ้นเท่ากับร้อยละ 87.23±0.13 เมื่อพิจารณาผลการทดลองถังหมัก 4 ที่มีการเพิ่มปริมาณหัวเชื้อเป็นร้อยละ 10

โดยปริมาตรต่อปริมาตร ส่งผลให้ปริมาณเซลล์เพิ่มสูงขึ้นทำให้ช่วงระยะเวลาในการผลิตกรดซัคซินิคนั้นสั้นลงจากชั่วโมงที่ 24 มาเป็นชั่วโมงที่ 20 โดยมีความเข้มข้นของกรดซัคซินิคต่ำลงเท่ากับ 46.83±3.95 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 4-4) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Agarwal et al. (2007) ที่พบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของหัวเชื้อให้สูงขึ้น ส่งผลให้ระยะเวลาในการหมักลดลง และไม่ส่งผลดีต่อการผลิตกรดซัคซินิคเนื่องจากองค์ประกอบของอาหารและธาตุอาหารที่จำเป็นสำหรับการหมักนั้นถูกใช้หมดอย่างรวดเร็ว

4. การศึกษาเทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบหลายกะลำดับต่อเนื่อง (Multiple sequential batch) ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

การศึกษาการผลิตกรดซัคซินิคจากน้ำตาลที่ได้จากการย่อยแป้งในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบหลายกะลำดับต่อเนื่อง เพื่อศึกษาความแตกต่างกันของผลผลิตกรดซัคซินิคที่ได้ในแต่ละกะ โดยอาศัยการต่อเชื้อจากกะเดิม มาใช้เป็นหัวเชื้อให้กะต่อไป ซึ่งผลการทดลองข้างต้น (ตารางที่ 4-5) แสดงให้เห็นว่ากะ 1 และ 2 นั้น มีผลการทดลองไปในทิศทางเดียวกัน แต่ปรากฏว่าให้ผลการทดลองที่มีแตกต่างกันกับกะที่ 3 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) การเพาะเลี้ยงกะ 3 นั้นให้ผลผลิตกรดซัคซินิคที่ต่ำกว่าเล็กน้อยเนื่องมาจากประสิทธิภาพที่ลดลงและอายุของเซลล์แบคทีเรียที่เพิ่มขึ้นซึ่งผ่านการเพาะเลี้ยงมาแล้ว 2 กะ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จึงเป็นสาเหตุที่ส่งผลลดลงต่อการผลิตกรดซัคซินิค

5. การศึกษาการใช้กากมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตกรดซัคซินิค

การย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดซัลฟิวริกที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน และย่อยที่อุณหภูมิแตกต่างกัน ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าอุณหภูมิเป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อการย่อยกากมันสำปะหลัง โดยการใช้อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส กรดซัลฟิวริกเข้มข้น 0.4 โมลาร์ สามารถผลิตน้ำตาลกลูโคสได้สูงที่สุดคือ 79.17 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้กรดซัลฟิวริกที่ความเข้มข้นมากกว่า 0.4 โมลาร์ ในการย่อยพบว่าทำให้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสลดลง และสารละลายที่ได้จะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้ม เนื่องจากเกิดผลิตภัณฑ์อื่นที่ไม่ต้องการ ซึ่งพบว่าสีน้ำตาลเข้มที่เกิดขึ้นนั้นเป็นผลมาจากการย่อยด้วยกรดที่มีความเข้มข้นสูง ทำให้เกิดปฏิกิริยาเคมีอื่น ๆ ก่อให้เกิดผลิตภัณฑ์ที่

ไม่ต้องการ เช่น เฟอฟิวรัล (Furfural) ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับ Zhang et al. (2013) ที่รายงานว่าเมื่ออุณหภูมิและความเข้มข้นของกรดซัลฟิวริกที่ใช้เพิ่มสูงขึ้น ส่งผลต่อประสิทธิภาพการย่อยกากมันสำปะหลัง และเกิดเฟอฟิวรัลเพิ่มสูงขึ้นเช่นเดียวกัน

การย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส กลูโคอะไมเลสและเซลลูเลสตามลำดับ สามารถผลิตน้ำตาลกลูโคสได้ปริมาณสูงที่สุดคือ 82.37 กรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นผลมาจากการทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส และกลูโคอะไมเลสที่ย่อยเม็ดแป้งที่เกาะอยู่บริเวณนอกเส้นใยของกากมันสำปะหลังให้กลายเป็นน้ำตาลกลูโคสส่วนหนึ่ง และการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสได้ย่อยเส้นใยเซลลูโลส ทำให้เม็ดแป้งที่อยู่ด้านในเส้นใยหลุดออก เป็นผลให้แป้งถูกเอนไซม์กลูโคอะไมเลสย่อยกลายเป็นน้ำตาลได้อีก

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพและต้นทุนในการย่อยกากมันสำปะหลังระหว่างการย่อยด้วยกรดและเอนไซม์แล้ว พบว่าการย่อยด้วยเอนไซม์เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพ แต่มีต้นทุนที่สูงกว่าการย่อยด้วยกรด ทั้งนี้เมื่อพิจารณาถึงการนำน้ำตาลที่ได้จากการย่อยไปใช้ประโยชน์ในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียแล้ว น้ำตาลที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์มีความเหมาะสมกว่า ทั้งด้วยความบริสุทธิ์ของผลิตภัณฑ์ที่สูง นำไปใช้ได้ง่าย และได้มาจากวิธีการทางชีวภาพ ดังนั้นจึงเลือกใช้วิธีการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์มาใช้ในการวิจัยต่อไป

การย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์ต้องใช้ระยะเวลายาวนานซึ่งเป็นการสิ้นเปลืองเวลาและพลังงาน เป็นการเพิ่มต้นทุนในกระบวนการผลิต (Teerapatr, Lerdluk, & Laaied, 2006) ทำให้เกิดการศึกษาการลดระยะเวลาการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์เซลลูเลส ซึ่งผลการทดลอง (ภาพที่ 4-40) ระยะเวลาที่เหมาะสมในการย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสคือ ที่เวลา 6 ชั่วโมง เนื่องจากเป็นสามารถผลิตน้ำตาลกลูโคสได้ในปริมาณสูงและหลังจากเวลานี้ระดับน้ำตาลกลูโคสคงที่ไปจนสิ้นสุดการทดลอง

จากผลการทดลองการหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์กลูโคอะไมเลสหลังจากผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสเป็นเวลา 6 ชั่วโมงและแอลฟาอะไมเลสเป็นเวลา 3 ชั่วโมงแล้ว พบว่าระยะเวลาที่เหมาะสมคือ ที่เวลา 10 ชั่วโมง ซึ่งสามารถผลิตน้ำตาลกลูโคสได้ในปริมาณสูงและพิจารณาจากค่า DE แล้ว พบว่าหลังจากชั่วโมงที่ 10 ค่า DE คงที่

ซึ่งแสดงว่าไม่มีการเปลี่ยนแป้งเป็นน้ำตาลกลูโคสแล้ว ดังนั้นจึงได้สภาวะการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์เซลลูเลสเป็นเวลา 6 ชั่วโมง แอลฟาอะไมเลสเป็นเวลา 3 ชั่วโมง และเอนไซม์กลูโคอะไมเลส เป็นเวลา 10 ชั่วโมง เพื่อให้ได้น้ำตาลจากการย่อยกากมันสำปะหลังไปใช้ในการผลิตกรดซัคซินิค

การผลิตกรดซัคซินิคจากน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยแบคทีเรียหมายเลข 37 โดยการเพาะเลี้ยงแบบหลายกะลำดับต่อเนื่อง แสดงให้เห็นว่าสามารถผลิตกรดซัคซินิคจากการย่อยกากมันสำปะหลังได้ และเมื่อเปรียบเทียบกับการผลิตกรดซัคซินิคจากแหล่งทรัพยากรหมุนเวียนที่ทดแทนได้ จะเห็นได้ว่ากากมันสำปะหลังสามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในกระบวนการหมักเพื่อผลิตกรดซัคซินิคได้อย่างมีประสิทธิภาพ (ตารางที่ 5-1)

ผลการทดลองการผลิตกรดซัคซินิคจากแบคทีเรียหมายเลข 37 ด้วยสภาวะที่แตกต่างกันตั้งแต่เริ่มต้นจนสิ้นสุดการทดลองแสดงดังตารางที่ 5-2 สังเกตเห็นได้ว่าเมื่อทำการขยายขนาดการผลิตขึ้น สามารถผลิตกรดซัคซินิคได้ปริมาณมาก ผลผลิตต่อน้ำตาลที่ใช้ไปและอัตราการผลิตกรดซัคซินิคเพิ่มสูงขึ้น ซึ่งเป็นผลจากสภาวะในการหมักที่มีประสิทธิภาพมากขึ้น เห็นได้ว่าก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เป็นปัจจัยสำคัญในการผลิตกรดซัคซินิค เมื่อมีการเติมตอนเริ่มต้นการผลิตในขวดรูปชมพู่และเติมอย่างต่อเนื่องในถังหมักจนสิ้นสุดระยะเวลาการหมักส่งผลให้สามารถผลิตกรดซัคซินิคได้สูงขึ้นตามลำดับ ปัจจัยองค์ประกอบในสูตรอาหาร แร่ธาตุ วิตามินที่เพียงพอและการกวนผสมที่เหมาะสมก็ส่งผลในทิศทางเดียวกันให้ได้ผลผลิต อัตราการผลิตที่เพิ่มสูงขึ้น และการใช้น้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนในกระบวนการหมัก สามารถผลิตกรดซัคซินิคได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ตารางที่ 5-1 เปรียบเทียบการผลิตกรดซัคซินิคจากแหล่งทรัพยากรหมุนเวียนที่ทดแทนได้

Renewable resources	**Strains**	**Methods**	**Succinic (g/L)**	**Succinic Yield (g/g)**	**Productivity (g/L/h)**	**References**
Sake lees	*A. succinogenes* 130Z	Batch	48.00	0.75	0.94	Chen et al., 2010
Corn fiber	*A. succinogenes* FZ6	Batch	70.60	0.88	0.70	Guettler et al., 1996
Whey	*A. succinogenes* 130Z	Batch	21.50	0.57	0.44	Wan et al., 2008
Wood hydrolyzate	*A. succiniciproducens*	Batch	24.00	0.88	0.74	Lee et al., 2003
Cane molasses	*E. coli* W3110	Batch	26.00	0.52	0.87	Agarwal et al., 2007
Corn stover	*A. succinogenes*	Fed-batch	53.20	0.83	1.21	Zheng et al., 2009
Starch hydrolysis	SA 37	Batch	46.83	0.49	2.34	This study
Starch hydrolysis	SA 37	Multiple sequential batch	49.13	0.44	2.05	This study
Cassava pulp	SA 37	Batch	46.27	0.61	1.93	This study
Cassava pulp	SA 37	Multiple sequential batch	42.53	0.54	1.77	This study

สรุปผลการวิจัย

1. สามารถคัดแยกแบคทีเรียหมายเลข 37 จากกระเพาะกระบือที่มีความสามารถในการผลิตกรดซัคซินิคได้
2. การผลิตกรดซัคซินิคด้วยแบคทีเรียหมายเลข 37 ต้องอาศัยสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง ซึ่งยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ที่ส่งผลดีต่อเซลล์ และสามารถผลิตกรดซัคซินิคได้สูง ในขณะที่น้ำตาลที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังสามารถนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนได้ และการใช้แมกนีเซียมคาร์บอเนตเป็นองค์ประกอบในสูตรอาหารทำให้สามารถควบคุมค่าความเป็นกรดด่างในระหว่างกระบวนการหมักและยังส่งผลดีต่อการผลิตกรดซัคซินิคซึ่งสามารถผลิตได้เท่ากับ 10.59 กรัมต่อลิตร
3. การปรับสูตรอาหารและสภาวะการผลิตกรดซัคซินิคในถังหมักขนาด 5 ลิตร ทำให้สามารถควบคุมสภาวะการหมักได้ดีขึ้น ส่งผลให้สามารถผลิตกรดซัคซินิคได้สูงกว่าการเพาะเลี้ยงในขวดรูปชมพู่
4. กากมันสำปะหลังสามารถนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตกรดซัคซินิคได้

ข้อเสนอแนะ

1. การคัดแยกแบคทีเรียในการศึกษานี้ทำการเก็บตัวอย่างจากกระเพาะกระบือเพียง 1 ตัวเท่านั้น ควรมีการทดลองต่อไปซึ่งเก็บตัวอย่างจากกระบือหลาย ๆ ตัว เพื่อให้เกิดความหลากหลายของแบคทีเรียที่คัดแยกได้
2. ควรจัดเตรียมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ไว้สำรองด้วย เพื่อใช้ในการเพาะเลี้ยงอย่างต่อเนื่อง เนื่องจากในการทดลองใช้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จำนวนมาก
3. การศึกษาการผลิตกรดซัคซินิคด้วยกระบวนการหมัก แบบหลายกะลำดับต่อเนื่องในการทดลองครั้งนี้ทำด้วยกัน 3 กะ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ควรเพิ่มการเพาะเลี้ยงให้มีจำนวนหลายกะมากยิ่งขึ้นเพื่อศึกษาผลการทดลองอื่น ๆ ที่เป็นไปได้
4. กากมันสำปะหลังที่ใช้ในการทดลองเมื่อได้นำมาแล้วควรเตรียมและเก็บในภาชนะที่มิดชิด เพื่อป้องกันความชื้นและแมลงมากัดกิน

5. ควรมีวัสดุ อุปกรณ์ และเครื่องมือในการวิเคราะห์ที่ดี มีคุณภาพและเพียงพอในการทดลองครั้งต่อไป ในงานวิจัยครั้งนี้มีการดัดแปลง ปรับเปลี่ยนอุปกรณ์ที่มีให้สามารถใช้งานตามความต้องการได้ เนื่องจากอุปกรณ์มีจำกัด

ตารางที่ 5-3 การผลิตกรดซัคซินิคจากแบคทีเรียหมายเลข 37 ด้วยสภาวะที่แตกต่างกัน

Fermentation	Initial glucose (g/L)	Residual glucose (g/L)	Glucose consumed (g/L)	Cell Biomass (g/L)	Specific growth rate (μ_{max}) (h^{-1})	Succinic (g/L)	Yield/ biomass (g/ g)	Succinic Yield (g/ g)	Efficiency (%)	Productivity (g/ L/ h)	Time (at) (h)
Vial	20.00	NA	20.00	NA	NA	1.37	NA	0.07	10.20	0.06	24
Flask no CO_2	20.00	NA	20.00	NA	NA	2.88	NA	0.14	21.51	0.12	24
Flask + CO_2	20.72	5.64	15.08	2.89	0.06	6.74	2.33	0.45	66.71	0.28	24
Flask + GSH	24.01	2.55	21.46	4.09	0.19	11.80	2.89	0.55	82.07	0.49	24
Batch 1	63.89	6.59	57.30	4.08	0.17	37.74	9.25	0.66	98.30	1.35	28
Batch 2	120.49	23.72	96.77	4.97	0.11	53.60	10.78	0.55	82.67	2.23	24
Batch 3	109.54	15.67	93.87	5.17	0.31	54.86	10.61	0.58	87.23	2.29	24
Batch 4	109.76	15.04	94.72	5.17	0.27	46.83	9.06	0.49	73.79	2.34	20
Multiple sequential batch											
(I)	125.77	13.95	111.82	5.00	0.32	50.28		0.45	67.11	2.10	24
(II)	125.88	13.53	112.35	5.07	0.32	50.48		0.45	67.06	2.10	24
(III)	125.91	12.14	113.77	4.83	0.34	46.64		0.41	61.19	1.94	24
Mean				4.97	0.33	49.13		0.44	65.12	2.05	

ตารางที่ 5-3 (ต่อ)

Fermentation	Initial glucose (g/L)	Residual glucose (g/L)	Glucose consumed (g/L)	Cell Biomass (g/L)	Specific growth rate (μ_{max}) (h^{-1})	Succinic (g/L)	Yield/ biomass (g/ g)	Succinic Yield (g/ g)	Efficiency (%)	Productivity (g/ L/ h)	Time (at) (h)
Multiple sequential batch + GPH											
(I)	110.09	24.89	85.20	4.15	0.32	37.93	9.14	0.45	66.45	1.58	24
(II)	107.89	31.43	76.46	4.05	0.30	43.38	10.71	0.57	84.68	1.81	24
(III)	108.10	32.45	75.65	3.88	0.26	46.27	11.93	0.61	91.29	1.93	24
Mean				4.03	0.29	42.53	10.56	0.54	80.80	1.77	

“หมายเหตุ” NA คือ ไม่มีผลวิเคราะห์, Initial glucose คือ ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น, Residual glucose คือ ปริมาณน้ำตาลคงเหลือ, Glucose consumed คือ ปริมาณการใช้น้ำตาล, Cell Biomass คือ น้ำหนักเซลล์แห้ง, Specific growth rate (μ) คือ อัตราการเจริญจำเพาะ, Succinic Yield คือ ผลผลิตกรดซัคซินิคต่อน้ำตาลที่ใช้ไป, Efficiency คือ ประสิทธิภาพการผลิต, Productivity คือ อัตราการผลิตกรดซัคซินิค, Time (at) คือ เวลาที่เลือกใช้, GSH คือ กลูโคสจากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง, GPH คือ กลูโคสจากการย่อยกากมันสำปะหลัง

บรรณานุกรม

กล้าณรงค์ ศรีรอต และเกื้อกูล ปิยะจอมขวัญ. (2546). เทคโนโลยีของแป้ง (พิมพ์ครั้งที่ 3). กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ประภัสสร หอมแสนศรี และ อิทธิพล ภู่กระจ่าง. (2553). การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตกรดซัคซินิคจากกระเพาะอาหารส่วนรูเมนของวัว. การศึกษาบัณฑิต, สาขาวิชาการสอนชีววิทยา , มหาวิทยาลัยบูรพา.

ปิตุนาต หนูแสน. (2547). การใช้กากมันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบแหล่งพลังงานในอาหารข้นต่อการให้ผลผลิตของโคนมลูกผสมพันธุ์โฮลสไตน์ฟรีเชียน. วิทยาศาตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.

พักตร์ประไพ ประจำเมือง. (2546). การผลิตกลูโคสไซรัปจากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพระดับโรงงานต้นแบบ. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ, คณะเทคโนโลยี, มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

ศศิธร ไกรฤทธิชัย. (2552). การแยกและการคัดกรองแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสเพื่อการย่อยสลายใบไม้. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต , สาขาชีววิทยา, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

สวลี ดีประเสริฐ, ศุภชัย บุญนำมา, วิทยา บุตรทองมูล, บุปผา ชินเชิดวงศ์ และวีระ โลหะ. (2555). การใช้ประโยชน์จากกากมันสำปะหลังเพื่อผลิตเป็นน้ำตาล. *วารสารมหาวิทยาลัยทักษิณ*, *15* (3), 39-46.

สิริวรรณ แก้วชิงดวง. (2554). การเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์จากกากมันสำปะหลังโดยการบำบัดขั้นต้น. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต , สาขาเทคโนโลยีและการจัดการสิ่งแวดล้อม , คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

หฤทัย ศิระวงษ์. (2547). การเพิ่มประสิทธิภาพการดูดซับประจุโลหะของกากมันสำปะหลังโดยการทำปฏิกิริยาเอสเทอร์ริฟิเคชันกับกรดซิตริก. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ, คณะอุตสาหกรรมเกษตร, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เปี่ยมสุข พงษ์สวัสดิ์. (2551). เอนไซม์ดัดแปรคาร์โบไฮเดรตในอุตสาหกรรม (พิมพ์ครั้งที่ 1). กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

Agarwal, L., Isar, J., Meghwanshi, G. K., & Saxena, R. K. (2006). A cost effective fermentative production of succinic acid from cane molasses and corn steep liquor by *Escherichia coli*. *Journal of Applied Microbiology, 100*, 1348–1354.

Agarwal, L., Isar, J., Dutt, K., & Saxena, R. K. (2007). Statistical optimization for succinic acid production from *E.coli* in a cost-effective medium. *Appl Biochem Biotech, 142*, 158-167.

Aghaziarati, M., Soltanieh, M., Kazemeini, M., & Khandan, N. (2008). Synthesis of tetrahydrofuran from maleic anhydride on Cu–ZnO–ZrO_2/H-Y bifunctional catalysts. *Catalysis Communications, 9*, 2195–2200.

Akihiko, K., Akihiko, K., Mitsuyoshi, U., Yoshinori, M., Pilanee, V., Warunee, T., Takamitsu A., & Yutaka, M. (2009). Production of ethanol from cassava pulp via fermentation with a surface engineered yeast strain displaying glucoamylase. *Renewable Energy, 34*, 1354–1358.

Anestis, V., Michael, B., Colin, W., & Constantinos, T. (2011) Glycerol utilization for the production of chemicals : Conversion to succinic acid, a combined experimental and computational study. *Biochemical Engineering Journal, 58-59*, 1-11.

Bazaes, S., Toncio, M., Laivenieks, M., Zeikus, J. G., & Cardemil, E. (2007). Comparative kinetic effects of Mn (II), Mg (II) and the ATP/ADP ratio on phosphoenolpyruvate carboxykinases from *Anaerobiospirillum succiniciproducens* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Protein J, 26*, 265-269.

Beauprez, J. J., Mey, D. M., & Soetaert, K. W. (2010). Microbial succinic acid production: Natural versus metabolic engineered producers. *Process Biochemistry, 45*, 1103–1114.

Chen, K., Zhang, H., Miao, Y., Jiang, M., & Chen, J. (2010). Succinic acid production from enzymatic hydrolysate of sake lees using *Actinobacillus succinogenes* 130Z. *Enzyme and Microbial Technology, 47*, 236–240.

Chen, K., Zhang, H., Miao, Y., Wei, P., & Chen, J. (2011). Simultaneous saccharification and fermentation of acid-pretreated rapeseed meal for succinic acid production using *Actinobacillus succinogenes*. *Enzyme and Microbial Technology, 48*, 339–344.

Chen, K., Li, J., Ma, F. J., Jiang, M., Wei, P., Liu, M. Z., & Ying, J. H. (2011). Succinic acid production by *Actinobacillus succinogenes* using hydrolysates of spent yeast cells and corn fiber. *Bioresource Technology, 102*, 1704–1708.

Chotineeranat, S., Pradistsuwana, C., Siritheerasas, P., & Tantratian, S. (2004). Reducing sugar production from cassava pulp using enzymes and ultrafiltration I: enzymatic hydrolyzation. *The Journal of Scientific Research Chulalongkorn University, 29*(2), 119-128.

Corona-Gonza´ lez, I. R., Bories, A., Gonza´ lez-A´ lvarez, V., & Pelayo-Ortiz, C. (2008). Kinetic study of succinic acid production by *Actinobacillus succinogenes* ZT-130. *Process Biochemistry, 43*, 1047-1053.

Cukalovic, A., & Stevens, C. V. (2008). Feasibility of production methods for succinic acid derivatives : a marriage of renewable resources and chemical technology. *Biofuels Bioproducts and Biorefining, 6*, 505-529.

Delhomme, C., Botz, W. D., & Kuhn, E. F. (2009). Succinic acid from renewable resources as a C4 building-block chemical - a review of the catalytic possibilities in aqueous media. *Green Chem, 11*, 13–26.

Domingues, C. M., & Peralta, R. M. (1993). Production of amylase by soil fungi and partial biochemical characterization of amylase of selected strain (*Aspergillus fumigates Fresennius*). *Canadain Journal of Microbiology, 39*, 681-685.

Dorado, P. M., Lin, K. C. S., Koutinas, A., Du, C., Wang, R., & Webb, C. (2009). Cereal-based biorefinery development: Utilisation of wheat milling by-products for the production of succinic acid. *Journal of Biotechnology, 143*, 51–59.

Elcio, R. B., & Nei, P. J. (2011). Succinic acid production from sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate by *Actinobacillus succinogenes*. *J Ind Microbiol Biot, 38*, 1001–1011.

Feng, Y., Yin, H., Wang, A., Xie, T., & Jiang, T. (2012) Selective hydrogenation of maleic anhydride to succinic anhydride catalyzed by metallic nickel catalysts. *Applied Catalysis A: General, 425– 426*, 205 – 212.

Gallmetzer, M., Meraner, J., & Burgstaller, W. (2002). Succinate synthesisand excretion by *Penicillium simplicissimum* under aerobic and anaerobic conditions. *FEMS Microbiol, 210*, 221–225.

Gokarn, R. R., Eiteman, M. A., & Altman, E. (1998). Expression of pyruvate carboxylase enhances succinate production in *Escherichia coli* without affecting glucose uptake. *Biotechnol Lett, 20*, 795–798.

Guettler, M. V., Jane, M. K., & Rumier, D. (1996). Method for making succinic acid, bacterial variants for use in the process and methods for obtaining variants. *US Patent, 5,* 573, 931.

Guettler, M. V., Jain, M. K., & Soni, B. K. (1998). Process for making succinic acid, microorganisms for use in the process and methods of obtaining the microorganisms. *US Patent, 5*, 723, 322.

Hameed, A., Keshavarz, T., & Evabs, C. S. (1999). Effect of dissolved oxygen tension and pH on the production of extracellular protease from a new isolate of *Bacillus subtilis* K2, for use in leather processing. *J Chem Technol Biotechnol, 74*, 5-8.

Hermiati, E., Azuma, J., Mangunwidjaja, D., Sunarti, T. C., Suparno, O., & Prasetya, B. (2011). Hydrolysis of carbohydrates in cassava pulp and tapioca flour under microwave irradiation. *Indonesian Journal of Chemistry, 11*(3), 238-245.

Huh, S. Y., Jun, Y., Hong, H., Lee, Y. S., & Hong, H. W. (2006). Effective purification of succinic acid from fermentation broth produced by *Mannheimia succiniciproducens*. *Process Biochemistry, 41*, 1461-1465.

Isar, J., Agarwal, L., Saran, S., & Saxena, K. R. (2006). Succinic acid production from *Bacteroides fragilis*: Process optimization and scale up in a bioreactor. *Anaerobe*, *12*, 231–237.

Isar, J., Agarwal, L., Saran, S., Kaushik, R., & Saxena, R. K. (2007). A statistical approach to study the interactive effects of process parameters on succinic acid production from *Bacteriodes fragilis*. *Anaerobe, 13*, 50–56.

Jantama, K., Haupt, M. J., Svoronos, S. A., Zhang, X., Moore, J. C., Shanmugam, K. T., & Ingram, L. O. (2008). Combining metabolic engineering and metabolic evolution to develop non-recombinant strains of *Escherichia coli* C that produce succinate and malate. *Biotechnol Bioeng, 99*, 1140–1153.

Jame, B., McKinlay, C., Vieille, J., & Zeikus, G. (2007). Prospects for a bio-based succinate industry. *Appl Microbiol Biotechnol, 76*, 727-740.

Jiang, M., Xu, R., Xi, L. Y., Zhang, H. J., Dai, Y. W., Wan, J. Y., Chen, Q. K., & Wei, P. (2013). Succinic acid production from cellobiose by *Actinobacillus succinogenes*. *Bioresource Technology, 135*, 469–474.

Lee, P. C., Lee, W. G., Lee, S. Y., & Chang, H. N. (1999). Effects of medium components on the growth of *Anaerobiospirillum succiniciproducens* and succinic acid production. Process. *Biochem, 35*, 49–55.

Lee, P. C., Lee, S. Y., Hong, S. H., & Chang, H. N. (2002). Isolation and characterization of a new succinic acid-producing bacterium, *Mannheimia succiniciproducens* MBEL55E, from bovine rumen. *Appl Microbiol Biot, 58*, 663–668.

Lee, P. C., Lee, S. Y., Hong, S. H., Chang, H. N., & Park, S. C. (2003). Biological conversion of wood hydrolysate to succinic acid by *Anaerobiospirillum succiniciproducens*. *Biotechnol Lett, 25*, 111-114.

Lee, S. J., Song, H., & Lee, S. Y. (2006). Genome-based metabolic engineering of *Mannheimia succiniciproducens* for succinic acid production. *Appl Environ Microbiol, 72*, 1939–1948.

Lee., Cheon, P., Lee, Y. S., & Chang, N. H. (2008). Succinic Acid Production by *Anaerobiospirillum succiniciproducens* ATCC 29305 Growing on Galactose, Galactose/Glucose, and Galactose/Lactose. *J. Microbiol. Biotechnol, 18*, 1792–1796.

Leung, C. J. C., Cheung, S. Y. A., Zhang, Y. Z. A., Lam, F. K., & Lin, S. K. C. (2012). Utilisation of waste bread for fermentative succinic acid production. *Biochemical Engineering Journal, 65*, 10–15.

Li, J., Jiang, M., Chen, K., Shang, L., Wei, P., Ying, H., Ye, Q., Ouyang, P., & Chang, H. (2010). Enhanced production of succinic acid by *Actinobacillus succinogenes* with reductive carbon source. *Process Biochemistry, 45*, 980–985.

Li, Q., Yang, M., Wang, D., Li, W., Wu, Y., Zhang, Y., Xing, Y., & Su, Z. (2010). Efficient conversion of crop stalk wastes into succinic acid production by *Actinobacillus succinogenes*. *Bioresource Technology, 101*, 3292–3294.

Li, J., Zheng, X., Fang, X., Liu, S., Chen, K., Jiang, M., Wei, P., & Ouyang, P. (2011). A complete industrial system for economical succinic acid production by *Actinobacillus succinogenes*. *Bioresource Technology, 102*, 6147–6152.

Lin, H., San, K. Y., & Bennett, G. N. (2005). Effect of Sorghum vulgare phosphoenolpyruvate carboxylase and Lactococcus lactis pyruvate carboxylase coexpression on succinate production in mutant strains of *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biot, 67*, 515–523.

Lin, K. S., Du, C., Koutinas, A., Wang, R., & Webb, C. (2008). Substrate and product inhibition kinetics in succinic acid production by *Actinobacillus succinogenes*. *Biochemical Engineering Journal, 41*, 128–135.

Liu, Y., Zheng, P., Sun, Z., Ni, Y., Dong, J., Zhu, L., & Wei, P. (2008). Strategies of pH control and glucose fed - batch fermentation for production of succinic acid by *Actinobacillus succinogenes* CGMCC1593. *J. Chem. Technol. Biotechnol, 83*, 722–729.

Liu, Y., Zheng, P., Sun, Z., Ni, Y., Dong, J., & Zhu, L. (2008). Economical succinic acid production from cane molasses by *Actinobacillus succinogenes*. *Bioresource Technology, 99*, 1736–1742.

Macy, J. M., Ljungdahl, E. G., & Gottschalk, G. (1978). Pathway of succinate and propionate formation in *Bacteroides fragilis*. *J. Bacteriol, 134*, 81-91.

Mckinlay, B. J., Vieille, C., & Zeikus, G. J. (2007). Prospects for a bio-based succinate industry. *Appl Microbiol Biotechnol, 76*, 727-740.

Moon, S. H., & Parulekar, S. J. (1991). Parametric study of protein production in batch and fed batch cultures of *Bacillus firmus*. *Biotechnol Bioeng, 37*, 467-483.

Oh., Jae, I., Lee, W. H., Park, H. C., Lee, Y. S., & Lee, J. (2008). Succinic Acid Production by Continuous Fermentation Process Using *Mannheimia succiniciproducens* LPK7. *J. Microbiol. Biotechnol, 18*, 908–912.

Okino, S., Inui, M., & Yukawa, H. (2005). Production of organic acids by *Corynebacterium glutamicum* under oxygen deprivation. *Appl Microbiol Biot, 68*, 475–480.

Pandey, A., Soccol, C. R., Nigam, P., Soccol, V. T., Vandenberghe, L. P. S. & Mohan, R. (2000). Biotechnological potential of agro-industrial residues. II: cassava bagasse. *Bioresource Technology, 74*, 81-87.

Podkovyrov, S. M., & Zeikus, J. G. (1993). Purification and characterization of phosphoenol pyruvate carboxykinase a catabolic CO_2 fixing enzyme from *Anaerobiospirillum succiniciproducens. J Gen Microbiol, 139*, 223-228.

Samuelov, N. S., Datta, R., Jain, M. K., & Zeikus, J. G. (1999). Whey fermentation by *Anaerobiospirillum succiniciproducens* for production of a succinatebased animal feed additive. *Appl Environ Microbiol, 65*, 2260–2263.

Sasithorn, K., & Tawiwan, K. (2015). Optimization of succinic acid production from crude glycerol by encapsulated *Anaerobiospirillum succinicproducens* uning response surface methodology. *International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics, 5*, 11-25.

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

Siriporn, C., Yuka, M., Wonnop, V., Kota, O., Gaku, S., Lee, H. S., & Ishikawa, K. (2012). Application of thermophilic enzymes and water jet system to cassava pulp. *Bioresource Technology, 126*, 87–91.

Sitha, C., Sunthorn, K., & Kaemwich, J. (2012). Production of succinic acid from sucrose and sugarcane molasses by metabolically engineered *Escherichia coli*. *Bioresource Technology, 103*, 329–336.

Song, H., & Lee, Y. S. (2006). Production of succinic acid by bacterial fermentation. *Enzyme and Microbial Technology, 39*, 352-361.

Song, H. H., Lee, J. W., Choi, S., You, J. K., Hong, W. H., & Lee, S. Y. (2007). Effects of dissolved CO_2 levels on the growth of *Mannheimia succiniciproducens* and succinic acid production. *Biotechnol Bioeng, 98*, 1296–1304.

Sriroth, K., Chollakup, R., Chotineeranat, S., Piyachomkwan, K., & Christopher, G.O. (2000). Processing of cassava waste for improved biomass utilization. *Bioresource Technology, 71*, 63-69.

Stols, L., & Donnelly, M. I. (1997). Production of succinic acid through overexpression of NAD(+) dependent malic enzyme in an *Escherichia coli* mutant. *Appl Environ Microbiol, 63*, 2695–2701.

Strobel, H. J., & Russel, J. B.(1991). Role of sodium in the growth of a ruminal selenomonad. *Appl Environ Microbiol, 57*, 1663-1669.

Sunee, C., Chidphong, P., Prodpran, S., & Sumate, T. (2004). Reducing Sugar Production from Cassava Pulp Using Enzymes and Ultrafiltration I: Enzymatic Hydrolyzation. *J. Sci. Res. Chula. Univ, 29*, 119-128.

Teerapatr, S., Lerdluk, K., & La-aied, S. (2006). Approach of Cassava Waste Pretreatments for Fuel Ethanol Production in Thailand. *J. Sci. Res. Chula. Univ, 31*.

Ukrit, R., Sutipa, T., Lily, E., & Verawat, C. (2009). Simultaneous non-thermal saccharification of cassava pulp by multi-enzyme activity and ethanol fermentation by *Candida tropicalis*. *Journal of Bioscience and Bioengineering, 107*, 488–493.

Urbance, S. E., Pometto III., A. L., Dispirito, A. A., & Denli, Y. (2004). Evaluation of succinic acid continuous and repeat-batch biofilm fermentation by *Actinobacillus succinogenes* using plastic composite support bioreactors. *Appl. Microbiol. Biotechnol, 65*, 664–670.

Vemuri, G. N., Eiteman, M. A., & Altman, E. (2002). Succinate production in dual-phase *Escherichia coli* fermentations depends on the time of transition from aerobic to anaerobic conditions. J. Ind. *Microbiol. Biotechnol, 28*, 325–332.

Vlysidis, A., Binns, M., Webb, C., & Theodoropoulos, C. (2011). Glycerol utilisation for the production of chemicals: Conversion to succinic acid a combined experimental and computational study. *Biochemical Engineering Journal, 58– 59*, 1– 11.

Wan, C. H., Li, Y. B., Shahbazi, A., & Xiu, S. N. (2008). Succinic acid production from cheese whey using *Actinobacillus succinogenes* 130Z. *Appl Biochem Biotech, 145*, 111-119.

Wu, H., Li, Z., Zhou, L., Xie, J., & Ye, Q. (2009). Enhanced anaerobic succinic acid production by *Escherichia coli* NZN111 aerobically grown on gluconeogenic carbon sources. *Enzyme and Microbial Technology, 44*, 165-169.

Woiciechowski, A. L., Nitsche, S., Pandey, A., & Soccol, C. R. (2002). Acid and Enzymatic Hydrolysis to recover Reducing Sugars from Cassava Bagasse: an Economic Study. *Brazilian Archives of Biology And Technology, 45*, 393-400.

Xi, L. Y., Chen, Q. K., Dai, Y. W., Ma, F. J., Zhang, M., Jiang, M., Wei, P., & Ouyang, K. P. (2013). Succinic acid production by *Actinobacillus succinogenes* NJ113 using corn steep liquor powder as nitrogen source. *Bioresource Technology, 136*, 775–779.

Zeikus, G. J., Jain, K. M., & Elankovan, P. (1999). Biotechnology of succinic acid production and markets for derived industrial products. *Appl Microbiol Biotechnol, 51*, 545-552.

Zheng, P., Dong, J., Sun, Z., Ni, Y., & Fang, L. (2009). Fermentative production of succinic acid from straw hydrolysate by *Actinobacillus succinogenes*. *Bioresource Technology, 100*, 2425–2429.

Zhang, J., Fang, Z., Deng, H., Zhang, X., & Bao, J. (2013). Cost analysis of cassava cellulose utilization scenarios for ethanol production on flowsheet simulation platform. *Bioresource Technology, 134*, 298-306.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและหัวเชื้อ

ภาคผนวก ก

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ Enrichment medium

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อโดยมีองค์ประกอบดังนี้

1.	Glucose	20.0	กรัม/ลิตร
2.	Peptone	5.0	กรัม/ลิตร
3.	Yeast extracts	5.0	กรัม/ลิตร
4.	K_2HPO_4	3.0	กรัม/ลิตร
5.	NaCl	2.0	กรัม/ลิตร
6.	$(NH_4)SO_4$	2.0	กรัม/ลิตร
7.	$CaCl_2.2H_2O$	0.2	กรัม/ลิตร
8.	$MgCl_2.6H_2O$	0.4	กรัม/ลิตร
9.	$MgCO_3$	15.0	กรัม/ลิตร
	น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

นำมาละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้เท่ากับ 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Broth (TSB)

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อโดยมีองค์ประกอบดังนี้

1.	Glucose	2.5	กรัม/ลิตร
2.	Tryptone	17.0	กรัม/ลิตร
3.	Soytone/Yeast extracts	3.0	กรัม/ลิตร
4.	NaCl	5.0	กรัม/ลิตร
5.	Dipotassium hydrogen phosphate	2.5	กรัม/ลิตร

นำมาละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้เท่ากับ 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3. อาหารเลี้ยงเชื้อ Screening Agar

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อโดยมีองค์ประกอบดังนี้

1. Glucose	5.0	กรัม/ลิตร
2. Peptone	23.0	กรัม/ลิตร
3. Yeast extracts	5.0	กรัม/ลิตร
4. Agar	12.0	กรัม/ลิตร
5. NaCl	2.0	กรัม/ลิตร
6. Na_2CO_3	0.4	กรัม/ลิตร
7. Cysteine-HCl	0.5	กรัม/ลิตร
8. Soluble pyrophosphate	0.25	กรัม/ลิตร
9. Hemin	10.0	มิลลิกรัมกรัม/ลิตร
10. Bromocresol green	0.04	กรัม/ลิตร

นำมาละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้เท่ากับ 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

4. อาหารเลี้ยงเชื้อ Production Medium 1

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อโดยมีองค์ประกอบดังนี้

1. Glucose	20	กรัม/ลิตร
2. Yeast extract	5	กรัม/ลิตร
3. Peptone	5	กรัม/ลิตร
4. NaCl	1	กรัม/ลิตร
5. K_2HPO_4	3	กรัม/ลิตร
6. $CaCl_2$	0.2	กรัม/ลิตร

7. $MgCl_2$	0.2	กรัม/ลิตร
8. $(NH_4)SO_4$	1	กรัม/ลิตร
9. $NaCO_3$	3.0	กรัม/ลิตร

นำมาละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้เท่ากับ 1,000 มิลลิลิตร ปรับค่า pH ให้เท่ากับ 6.5 ด้วย H_2SO_4 2 N จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

5. อาหารเลี้ยงเชื้อ Production Medium 2

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อโดยมีองค์ประกอบดังนี้

1. Glucose	25	กรัม/ลิตร
2. Yeast extract	5	กรัม/ลิตร
3. Trace element	1	มิลลิลิตร/ลิตร
4. NaCl	0.38	กรัม/ลิตร
5. $MgCl_2$	0.13	กรัม/ลิตร
6. $CaCl_2$	0.1	กรัม/ลิตร
7. K_2HPO_4	0.5	กรัม/ลิตร
8. KH_2HPO_4	0.75	กรัม/ลิตร
9. NH_2HPO_4	0.63	กรัม/ลิตร
10. NaH_2PO_4	0.63	กรัม/ลิตร
11. $MgCO_3$	12.5	กรัม/ลิตร

นำมาละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้เท่ากับ 1,000 มิลลิลิตร ปรับค่า pH ให้เท่ากับ 6.9 ด้วย H_2SO_4 2 N จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

6. อาหารหัวเชื้อสูตร 1

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อโดยมีองค์ประกอบดังนี้

1. Glucose	25	กรัม/ลิตร
2. Yeast extract	5	กรัม/ลิตร
3. Trace element	1	มิลลิลิตร/ลิตร
4. NaCl	0.38	กรัม/ลิตร
5. $MgCl_2$	0.13	กรัม/ลิตร
6. $CaCl_2$	0.1	กรัม/ลิตร
7. K_2HPO_4	0.5	กรัม/ลิตร
8. KH_2HPO_4	0.75	กรัม/ลิตร
9. NH_2HPO_4	0.63	กรัม/ลิตร
10. NaH_2PO_4	0.63	กรัม/ลิตร
11. $MgCO_3$	12.5	กรัม/ลิตร

นำมาละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้เท่ากับ 1,000 มิลลิลิตร ปรับค่า pH ให้เท่ากับ 6.9 ด้วย H_2SO_4 2 N จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เมื่อได้อาหารเลี้ยงเชื้อแล้วจะนำสต็อกหัวเชื้อมาใส่ในอาหาร ทำการปิดฝาด้วยจุกยาง นำมาอัดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เป็นเวลา 1 นาที แล้วรัดปากขวดด้วยพาราฟิล์มให้แน่น แล้วนำไปบ่มในตู้บ่มแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่า 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

7. อาหารหัวเชื้อสูตร 2

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อโดยมีองค์ประกอบดังนี้

1. Glucose	25	กรัม/ลิตร
2. Yeast extract	10	กรัม/ลิตร
3. Peptone	10	กรัม/ลิตร
4. NaCl	1	กรัม/ลิตร
5. $MgCl_2$	0.2	กรัม/ลิตร

6. $CaCl_2$	0.2	กรัม/ลิตร
7. K_2HPO_4	3	กรัม/ลิตร
8. Na_2CO_3	10	กรัม/ลิตร

นำมาละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้เท่ากับ 1,000 มิลลิลิตร ปรับค่า pH ให้เท่ากับ 6.9 ด้วย H_2SO_4 2 N จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เมื่อได้อาหารเลี้ยงเชื้อแล้วจะนำสต็อกหัวเชื้อมาใส่ในอาหาร ทำการปิดฝาด้วยจุกยาง นำมาอัดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เป็นเวลา 1 นาที แล้วรัดปากขวดด้วยพาราฟิล์มให้แน่น แล้วนำไปบ่มในตู้บ่มแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่า 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

การเตรียมสต็อกหัวเชื้อ (Inocculum)

นำเชื้อที่เก็บรักษาในอาหารแข็งมาทำการฟื้นฟูเพื่อทำการเตรียมสต็อกหัวเชื้อ โดยการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Production Medium 1) ในขวดรูปชมพู่ ทำการปิดปากขวดด้วยจุกยางพอสนิท จากนั้นนำมาอัดแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์เพื่อให้เกิดสภาวะไร้อากาศ โดยต่อสายแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ผ่านตัวกรองอากาศเข้ากับสายยางที่ต่อกับก้นขวดรูปชมพู่ เปิดแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์พร้อมกับคลายที่หนีบสายยางออกเพื่อให้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์เข้าไปในขวดรูปชมพู่ แล้วคลายจุกยางเล็กน้อย ทำการอัดแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์เป็นเวลา 1 นาที เสร็จแล้วปิดที่หนีบสายยางพร้อมกับปิดจุกยางให้แน่นแล้วนำพาราฟิล์มมารัดปากขวดกับจุกยางให้แน่น จากนั้นนำไปบ่มในตู้บ่มแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

เมื่อได้หัวเชื้อแล้วจะนำมาผสมกลีเซอรอลร้อยละ 15 ปริมาตรต่อปริมาตร แล้วแบ่งใส่หลอดๆ ละ 5 มิลลิลิตร ก่อนจะนำไปแช่แข็ง (-20 องศาเซลเซียส) เพื่อเก็บไว้เป็นสต็อกหัวเชื้อสำหรับใช้ในการทดลองต่อไป

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารเคมีและการวิเคราะห์

สารเคมี

1. PBS buffer (Phosphate buffer saline)

เตรียมโดยมีองค์ประกอบดังนี้

1. NaCl	8	กรัม/ลิตร
2. KH_2HPO_4	2.9	กรัม/ลิตร
3. Na_2HPO_4	2.9	กรัม/ลิตร
4. KCl	2	กรัม/ลิตร

นำมาละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้เท่ากับ 1,000 มิลลิลิตร ปรับค่า pH ให้เท่ากับ 7.4 จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. การเตรียมน้ำตาลที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้นร้อยละ 40 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

1. เตรียมแป้งมันสำปะหลัง 4,476 กรัมสำหรับผลิตน้ำเชื่อมกลูโคส 10 ลิตร
2. ผสมแป้งกับน้ำให้เข้ากันแล้วปรับให้ได้ 10 ลิตร ใส่น้ำแป้งสู่ถังหมักแล้วปรับอุณหภูมิให้เท่ากับ 95 องศาเซลเซียส
3. ใส่เอนไซม์แอลฟาอะไมเรส (α-amylase) ปริมาตร 4.476 มิลลิลิตร
4. ทำการย่อยเป็นเวลา 3 ชั่วโมง
5. เมื่อครบ 3 ชั่วโมงแล้วทำการลดอุณหภูมิให้เหลือ 65 องศาเซลเซียส
6. เติมเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (Glucoamylase) ปริมาตร 8.952 มิลลิลิตร จากนั้นทำการย่อยเป็นเวลา 20 ชั่วโมง
7. นำน้ำเชื่อมกลูโคสที่ได้มาวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ แล้วเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3. การเตรียมน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลัง

เตรียมตัวอย่างกากมันสำปะหลังความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร โดยชั่งกากมันสำปะหลัง 1,070 กรัม ใส่ในถังแล้วใส่น้ำกลั่นให้มีปริมาตรเท่ากับ 10 ลิตร กวนผสมให้เข้ากันแล้วนำไปปรับค่าความเป็นกรดด่างให้เท่ากับ 4.8 นำไปใส่ในถังหมักขนาด 10 ลิตร เปิดสวิตซ์มอเตอร์ใบกวนและควบคุมอุณหภูมิที่ 55 องศาเซลเซียส จากนั้นใส่เอนไซม์เซลลูเลส (Biocelle Fuel) ความเข้มข้น 0.05 มิลลิลิตรต่อกรัมเซลลูโลส ทำการย่อยเป็นเวลา 6 ชั่วโมง เสร็จแล้วนำมาทำการปรับค่าความเป็นกรดด่างให้เท่ากับ 6.5 ทำการกวนผสมให้เข้ากันแล้วนำใส่ถังหมัก ทำการเพิ่มอุณหภูมิให้เท่ากับ 85 องศาเซลเซียส เติมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสความเข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยน้ำหนัก ทำการย่อยเป็นเวลา 3 ชั่วโมง เสร็จแล้วนำออกมาใส่ถังเพื่อเตรียมสำหรับกระบวนการย่อยด้วยเอนไซม์กลูโคอะไมเลส

นำตัวอย่างที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสแล้วมาทำการลดอุณหภูมิให้ได้ 65 องศาเซลเซียสและปรับค่าความเป็นกรดด่างให้เท่ากับ 4.5 ทำการกวนผสมให้เข้ากันแล้วนำใส่ถังหมัก เปิดสวิตซ์มอเตอร์ใบกวน รักษาอุณหภูมิให้เท่ากับ 85 องศาเซลเซียส เติมเอนไซม์กลูโคอะไมเลสความเข้มข้นร้อยละ 0.2 โดยน้ำหนัก เป็นเวลา 10 ชั่วโมง เมื่อเสร็จแล้วนำไปเก็บในภาชนะให้เรียบร้อย

การวิเคราะห์

1. วิเคราะห์ความชื้น

1. นำจานแก้วไปอบในตู้อบร้อนที่อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง
2. นำจานแก้วมาใส่โถดูดความชื้นเป็นเวลา 24 ชั่วโมง
3. ชั่งตัวอย่าง 1 กรัม ใส่ในจานแก้ว
4. นำไปอบในตู้อบร้อนที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4-6 ชั่วโมง
5. นำออกมาใส่โถดูดความชื้นเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาชั่งน้ำหนักหลังอบ

ความชื้น (%) =[(น้ำหนักจานแก้วหลังอบ – น้ำหนักจานแก้วก่อนอบ)/ น้ำหนักตัวอย่าง] × 100

2. วิเคราะห์ค่าสมมูลเด็กโตส (DE)

เก็บตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดเก็บตัวอย่างที่ผ่านการชั่งน้ำหนักไว้เรียบร้อยแล้ว จากนั้นนำมาทำการปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วเทส่วนใสทิ้ง จากนั้นทำการล้างเอาองค์ประกอบอื่น ๆ ออกโดยการเติมน้ำกลั่นปริมาตร 1 มิลลิลิตรแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ทำการล้าง 2 ครั้ง หลังจากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วจึงนำมาชั่งน้ำหนักหลังอบ

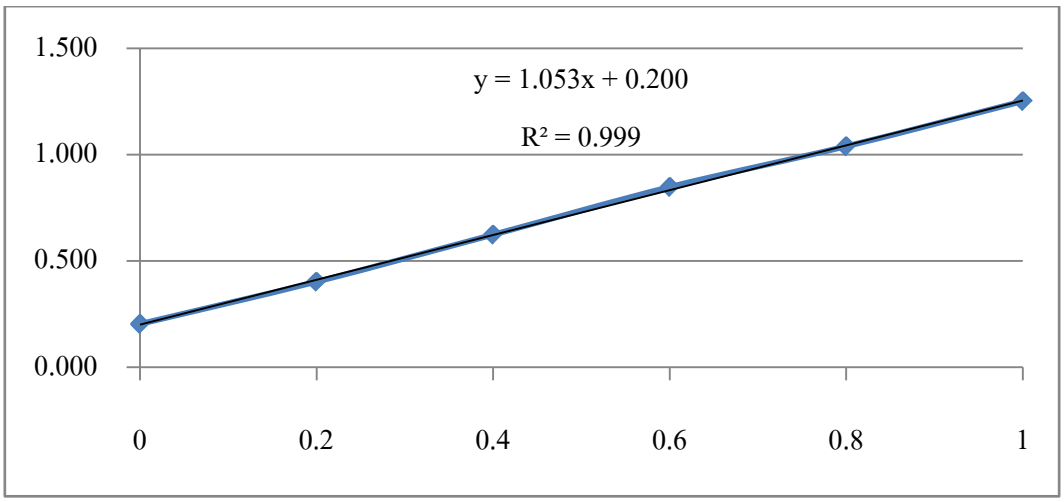
DE (%) = กลูโคส × 100 / (น้ำหนักหลอดหลังอบ – น้ำหนักหลอดก่อนอบ) × 1000

3. วิเคราะห์แป้งด้วยสารละลายไอโอดีน

การเตรียมสารละลายไอโอดีนโดยนำโพทัสเซียมไอโอไดด์ (KI) 5.0 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร จากนั้นเติมไอโอดีน 0.5 กรัมลงไป คนให้ละลาย แล้วจึงเติม 5N HCl ปริมาตร 5 มิลลิลิตรลงไป ปรับปริมาตรให้ได้ 0.5 ลิตรด้วยน้ำกลั่น

การเตรียมกราฟมาตรฐานสารละลายไอโอดีน

1. ชั่งแป้ง 0.1 กรัม นำมาละลายในน้ำปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดแก้วปริมาตร 100 มิลลิลิตร
2. นำสารละลายไปต้มให้เดือด ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร
3. ปิเปตสารละลายปริมาตร 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 มิลลิลิตรใส่ในหลอดทดลอง ปรับปริมาตรเป็น 1 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น
4. เติมสารละลายไอโอดีน ปริมาตร 5 มิลลิลิตรลงไปในแต่ละหลอด ผสมให้เข้ากัน
5. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร โดยเทียบกับ Blank ซึ่งเตรียมโดยใช้น้ำกลั่นปริมาตร 1 มิลลิลิตร แทนสารละลาย โดยทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ
6. นำค่าที่ได้มาเขียนกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นแป้ง (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) (ภาพภาคผนวก ข-1)



ภาพภาคผนวก ข-1 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นแป้ง (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

ภาคผนวก ค

ผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ตารางภาคผนวก ค-1 ผลวิเคราะห์การเปรียบเทียบ ความเข้มข้นของกรดซัคซินิคในการศึกษาอัตราการเจริญของของแบคทีเรียหมายเลข 37

Time	N	Subset for alpha = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
0	3	.00					
3	3		.70				
6	3			1.95			
12	3				4.43		
18	3					5.91	
30	3						6.59
48	3						6.71
24	3						6.74
36	3						6.78
42	3						6.90
Sig.		1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	.160

ตารางภาคผนวก ค-2 ผลวิเคราะห์ความแปรปรวน ความเข้มข้นของกรดซัคซินิคในการศึกษาแหล่งคาร์บอเนตในสูตรอาหารสำหรับการผลิตกรดซัคซินิค

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.449	3	.150	10.28	.024
Within Groups	.058	4	.015		
Total	.507	7			

ตารางภาคผนวก ค-3 ผลวิเคราะห์การเปรียบเทียบ ความเข้มข้นของกรดซัคซินิคในกระบวนการหมักเพื่อผลิตกรดซัคซินิคของถังหมัก 2

Duncan[a]											
		Subset for alpha = 0.05									
Time	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0	2	.00									
3	2	.00									
6	2		1.82								
9	2			11.22							
12	2				35.94						
16	2					47.00					
32	2						48.02				
28	2							49.10			
36	2								51.85		
20	2									52.74	
24	2										53.60
Sig.		1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00

ตารางภาคผนวก ค-4 ผลวิเคราะห์การเปรียบเทียบ ความเข้มข้นของกรดซัคซินิคในกระบวนการหมักเพื่อผลิตกรดซัคซินิคของถังหมัก 3

		Subset for alpha = 0.05									
Time	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0	2	.00									
3	2	.00									
6	2		2.19								

ตารางภาคผนวก ค-4 (ต่อ)

Time	N	Subset for alpha = 0.05									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
9	2			12.95							
12	2				34.42						
16	2					50.76					
28	2						51.77				
36	2							52.82			
20	2								54.32		
24	2									54.86	
32	2										55.64
Sig.		1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00

ตารางภาคผนวก ค-5 ผลวิเคราะห์การเปรียบเทียบ ความเข้มข้นของกรดซัคซินิคในกระบวนการหมักเพื่อผลิตกรดซัคซินิคของถังหมัก 4

Time	N	Subset for alpha = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
0	2	.00					
3	2	.39					
6	2		6.61				
9	2			19.34			
12	2				32.91		
16	2					44.50	

ตารางภาคผนวก ค-5 (ต่อ)

Time	N	Subset for alpha = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
28	2					44.95	
24	2					45.09	
20	2					46.83	46.83
36	2						48.35
32	2						48.52
Sig.		.777	1.00	1.00	1.00	.136	.255

ตารางภาคผนวก ค-6 ผลวิเคราะห์การเปรียบเทียบการผลิตกรดซัคซินิคแบบกะ (Batch) ด้วยแบคทีเรียหมายเลข 37 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

Succinic (g/L)

Batch	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
1	2	37.74		
4	2		46.82	
2	2			53.60
3	2			54.86
Sig.		1.00	1.00	.557

ตารางภาคผนวก ค-6 (ต่อ)

Succinic Yield (g/g)

Batch	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
4	2	.49		
2	2		.55	
3	2		.58	
1	2			.66
Sig.		1.00	.217	1.00

Efficiency (%)

Batch	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
4	2	73.78		
2	2		82.66	
3	2		87.23	
1	2			98.30
Sig.		1.00	.217	1.00

ตารางภาคผนวก ค-6 (ต่อ)

Productivity (g/L/h)

Batch	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
1	2	1.35	
2	2		2.23
3	2		2.28
4	2		2.34
Sig.		1.00	.342

ตารางภาคผนวก ค-7 ผลวิเคราะห์การเปรียบเทียบการผลิตกรดซัคซินิแบบหลายกะลำดับต่อเนื่อง (Multiple sequential batch) ด้วยแบคทีเรียหมายเลข 37 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

Succinic (g/L)

Multiple sequential batch	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
3	2	46.64	
1	2		50.28
2	2		50.48
Sig.		1.00	.484

ตารางภาคผนวก ค-7 (ต่อ)

Succinic Yield (g/g)

Multiple sequential batch	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
3	2	.410	
2	2		.45
1	2		.45
Sig.		1.00	.889

Efficiency (%)

Multiple sequential batch	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
3	2	61.18	
2	2		67.06
1	2		67.11
Sig.		1.00	.889

Productivity (g/L/h)

Multiple sequential batch	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
3	2	1.94	
1	2		2.10
2	2		2.10
Sig.		1.00	.484

ตารางภาคผนวก ค-8 ผลวิเคราะห์การเปรียบเทียบการศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์เซลลูเลส

Glucose (g/L)

Time	N	Subset for alpha = 0.05							
		1	2	3	4	5	6	7	8
0	3	.537							
2	3		2.157						
4	3			12.36					
8	3				15.61				
6	3					15.69			
12	3					15.69			
14	3					15.71			
10	3					15.76	15.76		
16	3					15.76	15.76		
18	3						15.81		
20	3							15.89	
24	3							15.94	15.94
22	3								15.99
Sig.		1.00	1.00	1.00	1.00	.065	.190	.140	.198

ตารางภาคผนวก ค-8 (ต่อ)

Starch (g/L)

Time	N	Subset for alpha = 0.05								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	3	30.44								
2	3		31.05							
4	3			35.50						
6	3				41.38					
10	3				41.39					
8	3				41.44	41.44				
12	3					41.67	41.67			
14	3						41.85	41.85		
16	3						41.88	41.88	41.88	
18	3							42.03	42.03	
20	3								42.11	
24	3									42.35
22	3									42.37
Sig.		1.000	1.000	1.000	.637	.058	.092	.150	.065	.891

ตารางภาคผนวก ค-9 ผลวิเคราะห์การเปรียบเทียบการศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์กลูโคอะไมเลส

Glucose (g/L)

Time	N	Subset for alpha = 0.05								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	3	24.06								
2	3		28.41							
4	3			32.60						
6	3				35.65					
8	3					45.05				
10	3						51.30			
12	3						52.57	52.57		
16	3						52.58	52.58		
14	3							53.66	53.66	
18	3								54.83	54.83
24	3								55.19	55.19
22	3								55.19	55.19
20	3									55.72
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	.122	.185	.075	.294

DE (%)

Time	N	Subset for alpha = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
0	3	26.87					
2	3		36.30				

ตารางภาคผนวก ค-9 (ต่อ)

Time	N	Subset for alpha = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
4	3			43.65			
6	3				62.13		
24	3					71.38	
8	3					74.98	74.98
14	3						76.46
10	3						76.84
20	3						76.90
16	3						76.97
22	3						77.12
12	3						77.26
18	3						77.87
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	.093	.238

ตารางภาคผนวก ค-10 ผลวิเคราะห์การเปรียบเทียบการผลิตกรดซัคซินิคจากน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยแบคทีเรียหมายเลข 37 โดยการเพาะเลี้ยงแบบหลายกะลำดับต่อเนื่อง

Succinic (g/L)

Multiple sequential batch	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
1	2	37.92		
2	2		43.38	
3	2			46.26
Sig.		1.000	1.000	1.000

Succinic Yield (g/g)

Multiple sequential batch	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
1	2	.44		
2	2		.57	
3	2			.61
Sig.		1.000	1.000	1.000

Efficiency (%)

Multiple sequential batch	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
1	2	66.44		
2	2		84.68	

ตารางภาคผนวก ค-10 (ต่อ)

Multiple sequential batch	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
3	2			91.28
Sig.		1.000	1.000	1.000

Productivity (g/L/h)

Multiple sequential batch	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
1	2	1.58		
2	2		1.81	
3	2			1.93
Sig.		1.000	1.000	1.000