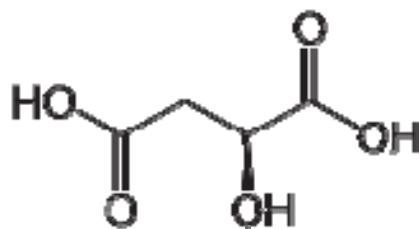


บทที่ 2

ตรวจเอกสาร

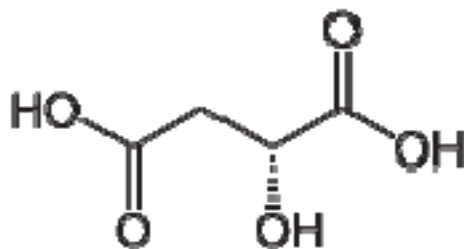
2.1 กรดมาลิก

กรดมาลิก (Malic acid) เป็นสารประกอบอินทรีย์ในกลุ่มกรดไดคาร์บอกซิลิกที่มีคาร์บอน 4 อะตอม และมีตำแหน่งคาร์บอกซิลิกที่ตำแหน่ง 1 และ 4 ซึ่งมีสูตรโมเลกุลคือ $\text{HO}_2\text{CCH}_2\text{CHOHCO}_2\text{H}$ ($\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_5$) ชื่อทางเคมี IUPAC คือ hydroxybutanedioic acid เป็นองค์ประกอบของเนื้อเยื่อ และเป็นสารตัวกลางในวัฏจักร Tricarboxylic acid cycle (TCA cycle) กรดมาลิกมีสูตรโครงสร้างดังรูปที่ 2.1 และรูปที่ 2.2 มีคุณสมบัติทางกายภาพ ดังตารางที่ 2.1 กรดมาลิกที่เป็นชนิดแอล-กรดมาลิกพบมากในธรรมชาติ เป็นองค์ประกอบในผักและผลไม้ เช่น แอปเปิ้ล องุ่น แตงโม เชอร์รี่ พลัม บลูเบอร์รี่ เป็นต้น ในขณะที่ชนิด ดี-กรดมาลิก จะถูกสังเคราะห์ขึ้น (Holler และคณะ, 1999 ; Michielsen และคณะ, 2000 ; Leathers และคณะ, 2013)



รูปที่ 2.1 สูตร โครงสร้างของแอล-กรดมาลิก (L-malic acid)

(Michielsen และคณะ, 2000)



รูปที่ 2.2 สูตร โครงสร้างของดี-กรดมาลิก (D-malic acid)

(Michielsen และคณะ, 2000)

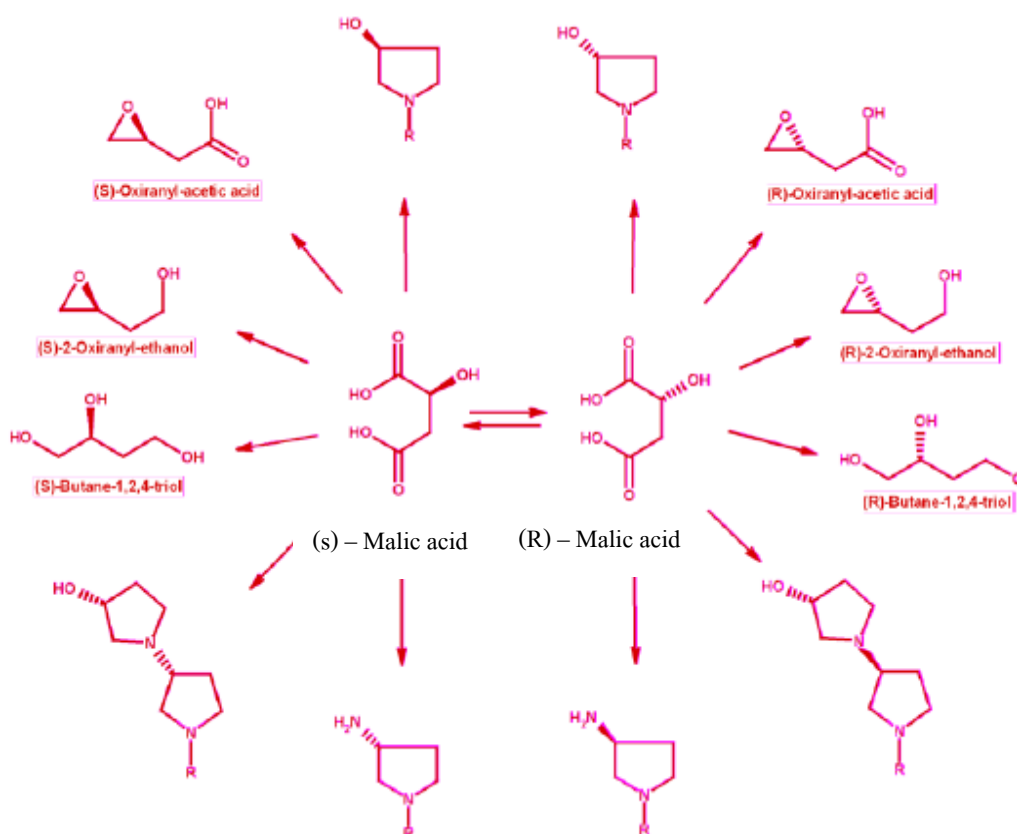
ตารางที่ 2.1 คุณสมบัติทางกายภาพของกรดมาลิก (ดัดแปลงจาก Goldberg และ Williams, 1991)

คุณสมบัติ	ค่า
มวลโมเลกุล (ดอลตัน)	134.09
ค่าถ่วงจำเพาะ	1.601
จุดหลอมเหลว (องศาเซลเซียส)	128.5 - 129
pKa	3.4
ความสามารถในการละลายที่ 25 องศาเซลเซียส (กรัม/100 มิลลิลิตร)	
- น้ำ	5.8 (25 องศาเซลเซียส)
- แอลกอฮอล์	39.16
- อีเทอร์	1.41

2.1.1 ประโยชน์ของกรดมาลิก

กรดมาลิกเป็นสารมูลค่าสูง มีความจำเป็นต่อมนุษย์ในชีวิตประจำวันอย่างมาก โดยใช้เป็นสารปรุงแต่งกลิ่นและรส ซึ่งกรดมาลิกมีความสามารถในการดูดความชื้นสูงมาก จึงมีการนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร เพื่อช่วยลดการดูดความชื้น การไม่จับกันเป็นก้อน การเกิดปฏิกิริยาสีน้ำตาล (browning reaction) และยืดอายุการเก็บอาหาร ดังนั้นจึงไม่จำเป็นต้องใช้สภาวะการเก็บอาหารที่พิเศษ และสามารถป้องกันอนุมูลอิสระและความชื้นได้

ในด้านอุตสาหกรรมอื่นๆ เช่น ในอุตสาหกรรมโพลีเมอร์ กรดมาลิกเป็นสารตั้งต้นในการผลิตกรดโพลีมาลิก ซึ่งกรดโพลีมาลิกจะนำไปใช้ในอุตสาหกรรมยา คือใช้เป็นสารเคลือบตัวยาและนำยาไปสู่กลุ่มเป้าหมาย (Huang และคณะ, 2012) ส่วนอนุพันธ์ของกรดโพลีมาลิกมีคุณสมบัติที่ไม่ละลายน้ำนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม เคลือบ หรือทำหน้าที่เป็น micro particles และ nanoparticles เป็นต้น (Vert, 1998) นอกจากนี้กรดมาลิกยังทำหน้าที่เป็นสารย่อยสลาย เช่นในอุตสาหกรรมย่อยพลาสติก และเป็นสารเคมีที่ใช้ในการทำความสะดวกโลหะต่างๆ เป็นต้น (Liu และ Steinbuchel, 1996) (รูปที่ 2.3)



รูปที่ 2.3 สารเคมีต่างๆ และผลิตภัณฑ์ที่สังเคราะห์ได้จากกรดมาลิก

(Zhou และคณะ, 2013)

2.1.2 มูลค่ากรดมาลิก

นอกจากประโยชน์ของกรดมาลิกที่สามารถนำไปใช้ได้ในการอาหาร เครื่องสำอาง ยา และอุตสาหกรรม พอลิเมอร์แล้ว และเมื่อนำมูลค่าของกรดมาลิกมาเปรียบเทียบกับกรดอินทรีย์ชนิดอื่นๆ พบว่ากรดมาลิกยังคงมีมูลค่าสูงกรดอินทรีย์บางชนิดอีกด้วย (ตารางที่ 2.2) และในปัจจุบันกรดมาลิกยังเป็นกรดอินทรีย์ที่กระทรวงพลังงานของสหรัฐอเมริกาสนใจและให้ความสำคัญในการผลิต เนื่องจากกรดอินทรีย์ถูกจัดเป็นสาร Building – Block ที่ใช้เป็นสารตั้งต้นในอุตสาหกรรมต่างๆ ได้หลากหลาย (Werpy และคณะ, 2004) ที่สามารถใช้จุลินทรีย์ผลิตจากวัสดุเหลือใช้และคาดว่าในอนาคตกรดมาลิกจะเป็นสารเคมีที่ได้รับความสนใจและต้องการใช้กันแพร่หลายในการอุตสาหกรรมต่างๆ มากกว่า 200,000 ตัน/ปี (Sauer และคณะ, 2008) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสนใจคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่ผลิตกรดมาลิกจากน้ำตาลไซโลสและศึกษากระบวนการผลิตกรดมาลิกเพื่อที่ต้นทุนการผลิตในระดับอุตสาหกรรม

ตารางที่ 2.2 มูลค่าของกรดมาลิกเมื่อเปรียบเทียบกับกรดอินทรีย์อื่นๆ (<http://www.sigmaaldrich.com/>)

Reagents	Units	Price (SGD*)
Malic acid	100 g	105.0
Succinic acid	100 g	62.00
Fumaric acid	100 g	65.70
Itaconic acid	100 g	49.30
Propionic acid	100 ml	82.30
Acetic acid	500 ml	122.00

*SGD = Singapore Dollar

2.2 การผลิตกรดมาลิก

การเตรียมกรดมาลิกโดยวิธีดั้งเดิม คือ การสกัดน้ำแอปเปิ้ล (มีกรดมาลิกประมาณ 0.4-0.7เปอร์เซ็นต์) ปัจจุบันสามารถผลิตกรดมาลิกได้จากกระบวนการทางเคมีและชีวภาพ

2.2.1 กระบวนการทางเคมี

การผลิตกรดมาลิกจากทั่วโลกประมาณ 85 เปอร์เซ็นต์ เป็นการสังเคราะห์ทางเคมีโดยปฏิกิริยาไฮเดรชันของกรดมาเลอิกหรือฟูมาริกและน้ำ 2 โมเลกุลที่อุณหภูมิและความดันสูง ผลผลิตที่ได้เป็นสารประกอบผสมดี-กรดมาลิก และ แอล-กรดมาลิก (Goldberg และคณะ, 2006)

2.2.2 กระบวนการทางชีวภาพ

การผลิตกรดมาลิกโดยกระบวนการทางชีวภาพจะใช้จุลินทรีย์เปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นกรดมาลิก โดยส่วนใหญ่จะใช้น้ำตาลที่ราคาไม่แพง และมีจำนวนมากที่ได้มาจากวัสดุลิกโนเซลลูโลสหรือชีวมวล (น้ำตาล) ซึ่งชีวมวลที่สามารถนำมาใช้ได้แบ่งได้เป็น 3 ประเภท

1. วัตถุดิบที่มีน้ำตาลสูง เช่น อ้อย กากน้ำตาล และผลไม้ต่างๆ ซึ่งสามารถนำเข้าสู่กระบวนการหมักได้โดยตรง
2. วัตถุดิบประเภทแป้ง เช่น ข้าวโพด ข้าวฟ่าง ข้าวสาลี และมันสำปะหลัง โดยก่อนที่จะเข้าสู่กระบวนการหมัก ต้องเปลี่ยนวัตถุดิบประเภทนี้เป็นน้ำตาลก่อนโดยใช้เอนไซม์และเข้าสู่การหมักต่อไป
3. วัสดุคิกโนเซลลูโลส เช่น ฟางข้าว ชานอ้อย ไม้เนื้ออ่อนเป็นต้น ก่อนนำวัสดุคิกโนเซลลูโลสไปใช้จะต้องผ่านการปรับสภาพ และถูกเปลี่ยนเป็นน้ำตาลก่อนโดยใช้เอนไซม์ และนำไปหมักเพื่อผลิตกรดมาลิก

เนื่องจากการผลิตกรดมาลิกจากวัตถุดิบที่มีแป้งและน้ำตาลสูงนั้น มีข้อจำกัดคือ มีราคาสูง และสามารถเปลี่ยนเป็นวัตถุดิบขึ้นต้นเป็นผลิตภัณฑ์อย่างอื่นได้แก่ อาหารคนและสัตว์ซึ่งถือว่ามีความสำคัญมากกว่านำมาผลิตกรดอินทรีย์หรือพลังงาน ปัจจุบันจึงมีความสนใจที่จะผลิตกรดมาลิกจากวัสดุคิกโนเซลลูโลส ที่ได้มาจากวัสดุเหลือทิ้งแหล่งต่างๆ เช่น ฟางข้าว ชานอ้อย ไม้เนื้ออ่อนเป็นต้น เนื่องจากมีราคาถูก และมีปริมาณมากพอที่นำไปกรดมาลิกและพลังงานทางเลือกอื่นๆ ได้ (รูปที่ 2.4)

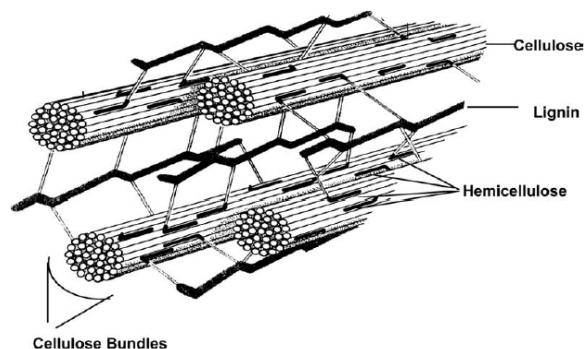


รูปที่ 2.4 กระบวนการผลิตสารมูลค่าสูงจากน้ำตาล แป้ง และวัตถุดิบโนเซลลูโลสโดย กระบวนการทางชีวภาพ

(ดัดแปลงจาก Glazer และ Nikaido, 2007)

2.2.2.1 วัสดุลิกโนเซลลูโลส

วัสดุลิกโนเซลลูโลส (Lignocellulosic Material) เป็นพอลิเมอร์ชีวภาพที่มีมากที่สุดในธรรมชาติที่สามารถปลูกได้ใหม่ในระยะเวลาอันสั้น เพราะเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์พืชส่วนประกอบที่พบในพืชเป็นส่วนใหญ่ ทั้งพืชตระกูลหญ้า ไม้เนื้อแข็ง และไม้เนื้ออ่อน มีองค์ประกอบเป็นเซลลูโลส (Cellulose) เฮมิเซลลูโลส (Hemicellulose) และลิกนิน (Lignin) (Sjostrom, 1981) (รูปที่ 2.5) โดยเซลลูโลสเป็นพอลิเมอร์ของน้ำตาลกลูโคสต่อกันเป็นสายยาว แต่ละสายของเซลลูโลสจะเกิดพันธะไฮโดรเจนสร้างเป็นรูปแบบผลึก (Crystalline) และแบบโครงสร้างหลวม (Amorphous) มีลักษณะเป็นเส้นใยเหนียว และไม่ละลายน้ำ เฮมิเซลลูโลสเป็นพอลิเมอร์ของน้ำตาลเพนโทส (Pentose) ซึ่งมีน้ำตาลไซโลสเป็นองค์ประกอบหลัก นอกจากนี้ประกอบด้วยน้ำตาล แมนโนส (Mannose) กลูโคส (Glucose) และ อะราบินโนส (Arabinose) เป็นต้น ส่วนลิกนินเป็นพอลิเมอร์ของฟีนิลโพรเพน (Phenylpropane) มีโครงสร้างซับซ้อนที่ทำหน้าที่สร้างความแข็งแรงจึงทนต่อการย่อยสลาย วัสดุลิกโนเซลลูโลสส่วนมากเป็นผลพลอยได้จากผลผลิตทางการเกษตร เช่น เศษเหลือใช้จากการทำสวน ปาล์ม ต้นปาล์ม เส้นใยปาล์ม ทางใบปาล์ม ทะลายปาล์ม จากพืชไร่และนาข้าวได้แก่ ฟางข้าว ชานอ้อย ชังข้าวโพด รำข้าว อุตสาหกรรมแปรรูปไม้ และกระดาษ เช่น เศษไม้ เศษกระดาษ จีเลื่อย วัชพืช เป็นต้น (สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลผลิตทางการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร, 2549) องค์ประกอบของวัสดุลิกโนเซลลูโลสของพืชแต่ละชนิดดังแสดงในตารางที่ 2.3



รูปที่ 2.5 โครงสร้างลิกโนเซลลูโลสซึ่งเป็นส่วนประกอบในผนังเซลล์พืช

(Zhang และ Lynd, 2004)

ตารางที่ 2.3 ปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินในพืชต่างๆ (Reshamwala และคณะ, 1995)

ประเภท	ชนิดชีวมวล	เซลลูโลส (ร้อยละ)	เฮลิเซลลูโลส (ร้อยละ)	ลิกนิน (ร้อยละ)
ข้าว	แกลบ	28-36	12	9-20
	ฟางข้าว	32-47	19-27	5-24
อ้อย	ชานอ้อย	34.08	20.31	8.93
	ใบ/ยอด (สด)	30.0	29.7	7.2
	ใบ/ยอด (อบแห้ง)	Na	27.02	5.36
ปาล์มน้ำมัน	ลำต้นปาล์ม	37.14	30.59	22.32
	ทะลาย เส้นใย	25-50	20-35	18-35
	ทางใบปาล์ม	25-50	20-35	18-35
มันสำปะหลัง	ลำต้น	82.14	11.41	6.45
ข้าวโพด	ชัง	34.3	39.0	14.4
ผักตบชวา	ลำต้นและใบ	43-44	Na	12-13
สับปะรด	ลำต้นและใบ	49.22	Na	17.41

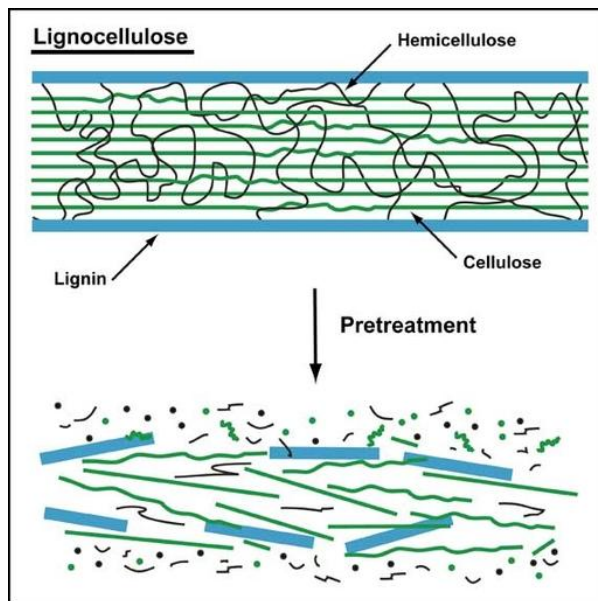
หมายเหตุ Na คือ not available

2.2.2.2 ขั้นตอนการผลิตกรดมาลิกจากวัสดุลิกโนเซลลูโลส

การผลิตกรดมาลิก หรือไบโอรีไฟเนอรี่ต่างๆ รวมถึงพลังงานทางเลือกอื่นๆ ที่ผลิตจากวัตถุดิบพวกลิกโนเซลลูโลสจะต้องผ่านขั้นตอน 3 ขั้นตอนหลักๆ คือ ขั้นตอนแรกเป็นการปรับสภาพวัตถุดิบ (pretreatment) เพื่อทำลายโครงสร้างและกำจัดลิกนินเพื่อให้่ายต่อการย่อยสลาย ในขั้นตอนที่สองเรียกว่า การไฮโดรไลซิส (hydrolysis) เพื่อย่อยสลายเซลลูโลสเป็นน้ำตาลกลูโคส และเฮมิเซลลูโลสเป็นน้ำตาล ไซโลส แมนโนส กาแลคโตส และ อะราบิโนส ขั้นตอนที่สามเป็นขั้นตอนการหมัก (Fermentation) โดยใช้จุลินทรีย์หมักน้ำตาลเพื่อเปลี่ยนเป็นกรดมาลิกหรือสารมูลค่าสูง (Olsson และ Hahn-Hagerdal, 1996)

1. การปรับสภาพขั้นต้น (Pretreatment)

ลิกโนเซลลูโลสเป็นสารที่มีความแข็งแรงยากต่อการย่อยสลายจึงต้องมีการการปรับสภาพวัสดุลิกโนเซลลูโลส มีวัตถุประสงค์เพื่อกำจัดลิกนิน ออกจากเซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลส เพื่อเพิ่มความเป็นรูปพรุนของวัตถุดิบ และช่วยให้การย่อยสลายด้วยเอนไซม์มีประสิทธิภาพมากขึ้นเนื่องจากการกำจัดลิกนินที่อยู่บริเวณรอบๆ เซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส ช่วยเพิ่มพื้นที่ผิวในการเข้าทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ (รูปที่ 2.6) (Mcmillan, 1994)



รูปที่ 2.6 การปรับสภาพโครงสร้างของลิกโนเซลลูโลส

(<http://www.ucl.ac.uk/chemeng/people/academic-researchers/ramirez>)

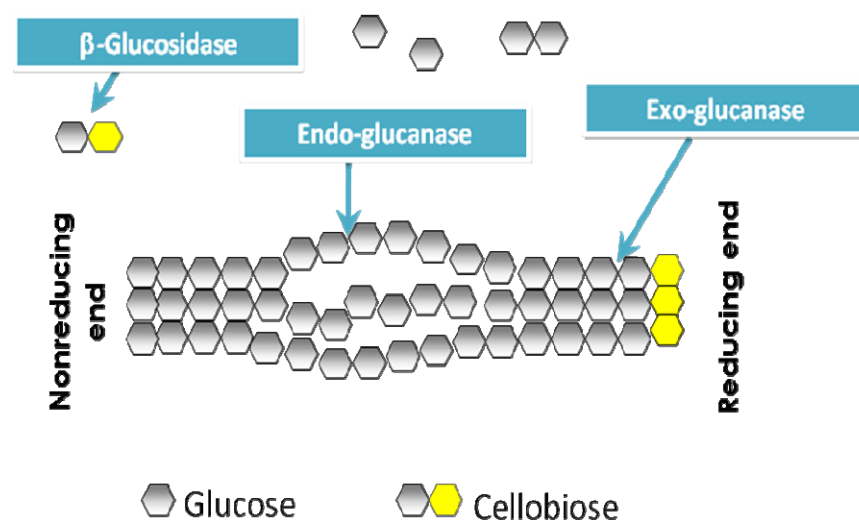
การปรับสภาพลิกโนเซลลูโลสอาจทำได้โดยใช้วิธีทางกายภาพ วิธีทางเคมี วิธีทางกายภาพร่วมกับวิธีทางเคมี และวิธีทางชีวภาพ ตัวอย่างเช่น mechanical pretreatment, dilute acid pretreatment และ steam hot water ซึ่งสามารถละลายลิกนิน งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะคัดแยกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการหมักน้ำตาลไซโลสเป็นกรดมาลิก วิธีที่เหมาะสมต่อการปรับสภาพวัสดุลิกโนเซลลูโลสเพื่อสกัดเฮมิเซลลูโลส คือ Alkaline peroxide ซึ่งข้อดีของวิธีนี้คือ เป็นวิธีที่ทำง่ายและใช้เวลาสั้น สามารถย่อยสลายลิกนินได้มาก และเฮมิเซลลูโลสไม่ถูกย่อย หลังจากการปรับสภาพด้วยวิธีนี้จะทำให้ขนาดของสับเสตรที่มีขนาดเล็กลง จึงทำให้ง่ายต่อการทำงานของเอนไซม์ในขั้นตอนของการย่อยสลาย (hydrolysis) (Toquero และ Bolado, 2014) แต่มีข้อเสียคือไม่สามารถย่อยสลายเซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลสได้ จึงจำเป็นต้องผ่านกระบวนการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์

2. การไฮโดรไลซิส (Hydrolysis)

การไฮโดรไลซิส คือ กระบวนการเปลี่ยนเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสเป็นน้ำตาล เมื่อเซลลูโลสถูกย่อยด้วยเอนไซม์และเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์จะได้น้ำตาลกลูโคสอย่างเดียว แต่กรณีที่ย่อยเกิดไม่สมบูรณ์จะเกิดทั้งกลูโคส เซลโลไบโอส และโอลิโกแซคคาไรด์ ส่วนเฮมิเซลลูโลสจะได้น้ำตาลหลายชนิดปะปนกัน ขึ้นอยู่กับโครงสร้างของน้ำตาลในเฮมิเซลลูโลส การไฮโดรไลซิสเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสมืออยู่ด้วยกันหลายวิธี แต่ในปัจจุบันนี้การไฮโดรไลซิสที่ยังเป็นที่สนใจที่วิจัยและพัฒนาอย่างต่อเนื่องคือการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ เนื่องจากสถานะที่ทำให้ปฏิกิริยาไม่รุนแรง ปริมาณน้ำตาลที่ได้บริสุทธิ์ ราคาประหยัด และเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม

เอนไซม์ในกลุ่มเซลลูเลส (Cellulolytic enzyme system)

ลิกโนเซลลูโลสเมื่อผ่านการปรับสภาพ (pretreatment) มีองค์ประกอบหลักคือ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส แต่ละองค์ประกอบนี้มีโครงสร้างที่แตกต่างกัน จึงต้องใช้เอนไซม์ในการย่อยสลายที่แตกต่างกัน เซลลูโลสมีโครงสร้างที่เป็นกลูโคส ต่อกันด้วยพันธะ β -1, 4-Glucosidic linkage เพราะฉะนั้นในการย่อยสลายเซลลูโลส จึงต้องใช้เอนไซม์กลุ่ม Cellulolytic enzymes ซึ่งประกอบด้วย เอนไซม์เชิงซ้อน 3 ส่วนดังนี้ Endoglucanase ($1,4\text{-}\beta\text{-D-glucan-4-glucanohydrolase}$; EC 3.2.1.4) ทำหน้าที่ย่อย β -1,4-Glucosidic linkage โดยจะตัดแบบสุ่มภายในสายจะได้ cello-oligosaccharide, glucose, cellobiose เอนไซม์ชนิดต่อมาคือ Exoglucanase ($1,4\text{-}\beta\text{-D-glucan cellobiohydrolase}$; EC 3.2.1.91) ทำหน้าที่ร่วมกับ Endoglucanase ในการย่อยสลายเซลลูโลสจากปลายด้าน non-reducing ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อย (รูปที่ 2.7)

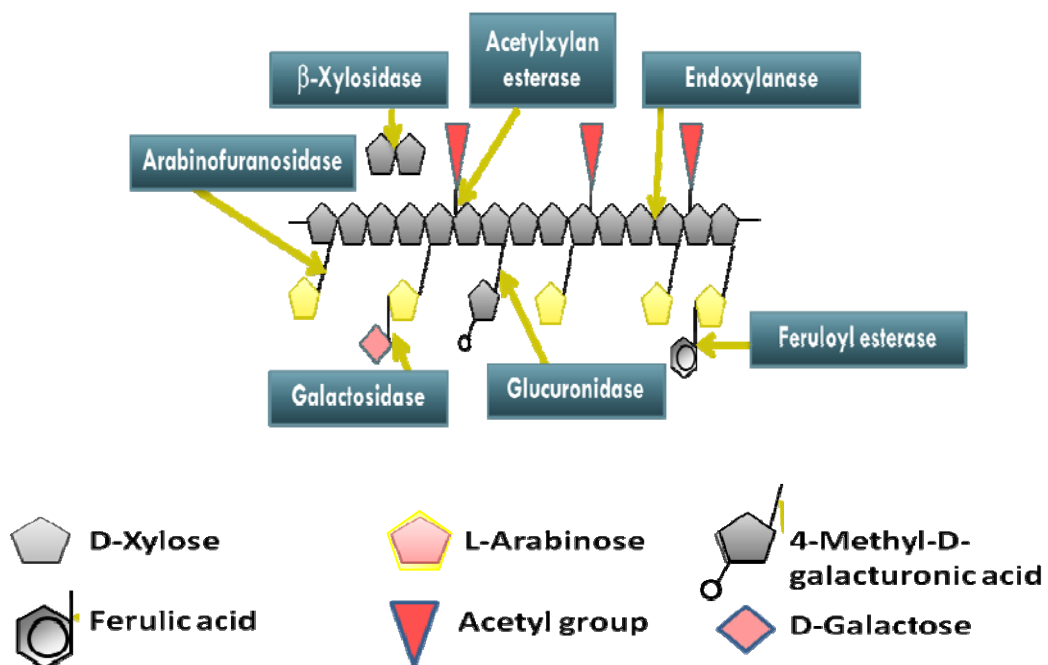


ภาพที่ 2.7 การทำงานร่วมกันของเอนไซม์ในกลุ่มเซลลูเลส

(Ratanakhanokchai และคณะ, 2013)

เอนไซม์ในกลุ่มไซลานเนส (Xylanolytic enzyme system)

เฮมิเซลลูโลสเป็น heteropolysaccharide ที่มีไซโลสเป็นโครงสร้างหลักและมี branch chain เป็นน้ำตาลและอนุพันธ์ของน้ำตาลชนิดอื่น ดังนั้นเฮมิเซลลูโลสจึงต้องการกิจกรรมของระบบเอนไซม์หลายชนิดที่ทำงานร่วมกัน (รูปที่ 2.4) เช่น เอนไซม์ที่ย่อยโครงสร้างหลัก (endoxylanase และ β -xylosidase) และเอนไซม์ที่ย่อย branch chain (α -glucuronidase, acetyl xylan esterase และ α -arabinofuranosidase) โดยเอนไซม์ทั้งสองกลุ่มทำงานร่วมกันในการเปลี่ยนไซแลนให้เป็นไซโลส (รูปที่ 2.8) (Maheshwari และคณะ, 2000 ; Kosugi และคณะ, 2001 ; Lama และคณะ, 2004)



รูปที่ 2.8 การทำงานร่วมกันของเอนไซม์ในกลุ่มไซลานเนส

(Ratanakhanokchai และคณะ, 2013)

องค์ประกอบของน้ำตาลที่อยู่ในวัสดุลิกโนเซลลูโลส

หลังจากเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสถูกไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์คือ เซลลูโลโลไลติก และ ไซลาลิติก โดยย่อยเซลลูโลสเป็นน้ำตาลกลูโคส และย่อยเฮมิเซลลูโลสเป็นน้ำตาลไซโลส แมนโนส กาแลคโตส และ อะราบินอส ตามลำดับ (Taher zadeh และ Karimi, 2008; Jeffries และ Sreenath, 1988) น้ำตาลที่ได้จากการย่อยสลายเฮมิเซลลูโลสส่วนใหญ่ร้อยละ 30 – 45 ของน้ำตาลทั้งหมดเป็นน้ำตาลเพนโตส (Lin and Cheng, 2006) (ตารางที่ 2.4) จากนั้นในกระบวนการหมักใช้จุลินทรีย์หมักน้ำตาลเพื่อเปลี่ยนเป็นกรดมาลิก จากรายงานของ Wang และคณะ (2013) ศึกษา *Penicillium sclerotiorum*

K302 พบว่าการผลิตแคลเซียมมาลิกสูงสุด 88.6 กรัม/ลิตร มีค่าผลได้เท่ากับ 0.81 กรัม/กรัมน้ำตาลกลูโคส ค่ากำลังการผลิตเท่ากับ 1.23 กรัม/ลิตร/ชั่วโมง โดยใช้น้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น 140 กรัม/ลิตร และเติมแคลเซียมคาร์บอเนต 50 กรัม/ลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ความเร็ว 300 รอบ/นาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง และจากรายงานของ Ma และคณะ (2013) พบว่า *Aureobasidium* sp. P6 สามารถผลิตกรดโพลีมาลิกได้สูงสุดได้ 100.7 กรัม/ลิตร เมื่อใช้น้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น 140 กรัม/ลิตร เติมแคลเซียมคาร์บอเนต 65 กรัม/ลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ความเร็ว 180 รอบ/นาที เป็นเวลา 7 วัน ซึ่งเห็นว่าจุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตส่วนใหญ่มีความสามารถในการหมักน้ำตาลกลูโคสได้เพียงชนิดเดียว ทำให้กรดมาลิกที่ได้จากการหมักมีปริมาณน้อย เพราะน้ำตาลเพนโตสไม่สามารถถูกเปลี่ยนเป็นกรดมาลิก

ตารางที่ 2.4 องค์ประกอบน้ำตาลของวัสดุกลีโคโนเซลลูโลสหลังจากการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ (Alvira และคณะ, 2010)

Lignocellulose	Cellulose	Hemicellulose			
	Glucan	xylan	Arabinan	Mannan	Galactose
Sugarcane bagase	40.2	22.5	2	0.5	1.4
Wheat straw	32.1	19.5	2.8	0.6	1.1
Corn stover	37.5	21.7	2.7	0.6	1.6
Switch grass	34.2	22.8	3.1	0.3	1.4
Pine wood	44.8	17	2	2.1	2

3.การหมัก (Fermentation)

การหมัก (Fermentation) ในทางชีวเคมีหมายถึงการสร้างพลังงานจากกระบวนการย่อยสลายสารประกอบอินทรีย์หรือการเปลี่ยนแปลงทางเคมีของสารประกอบอินทรีย์ การหมักในทางจุลชีววิทยาอุตสาหกรรมหมายถึงกระบวนการผลิตใดๆ ก็ตามที่ได้จากการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์จำนวนมาก (mass culture) ซึ่งจะครอบคลุมทั้งกระบวนการแบบใช้และไม่ใช้ออกซิเจน ซึ่งกระบวนการหมักนำมาใช้เพื่อเปลี่ยนน้ำตาลเป็นสารมูลค่าสูง เช่น กรดมาลิก

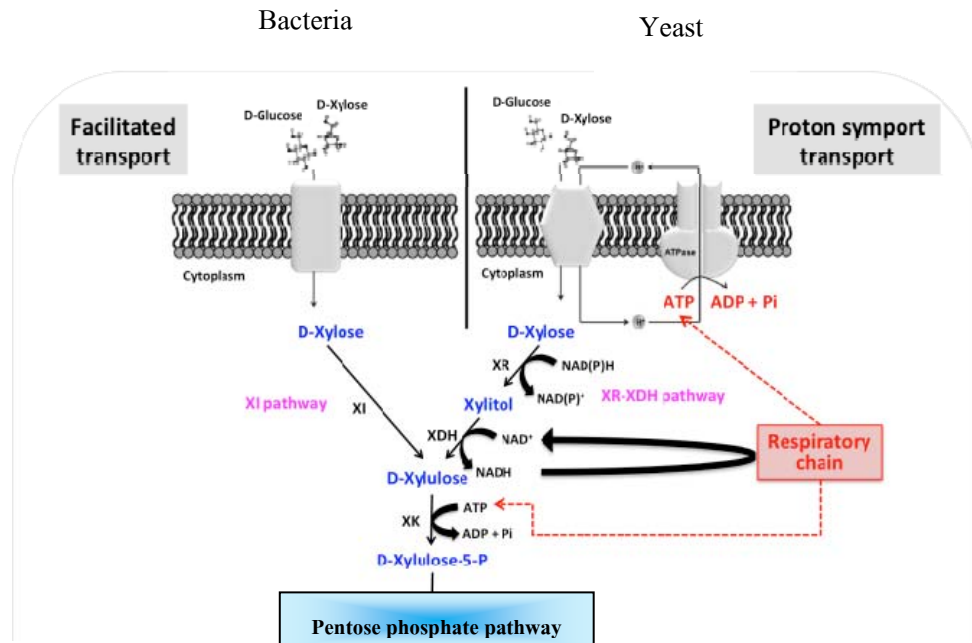
2.3 การผลิตกรดมาลิกจากจุลินทรีย์

น้ำตาลเป็นคาร์โบไฮเดรตชนิดหนึ่งเป็นแหล่งพลังงานที่สำคัญของสิ่งมีชีวิตรวมถึงจุลินทรีย์ ดังนั้น จุลินทรีย์จึงมีกลไกต่างๆที่เปลี่ยนน้ำตาลเป็นแหล่งพลังงานเพื่อใช้เจริญและผลิตสารต่างๆรวมถึง กรดมาลิก

2.3.1 วิธีเพนโตสฟอสเฟต (Pentose phosphate pathway : PPP หรือ Hexose monophosphate shunt : HMS)

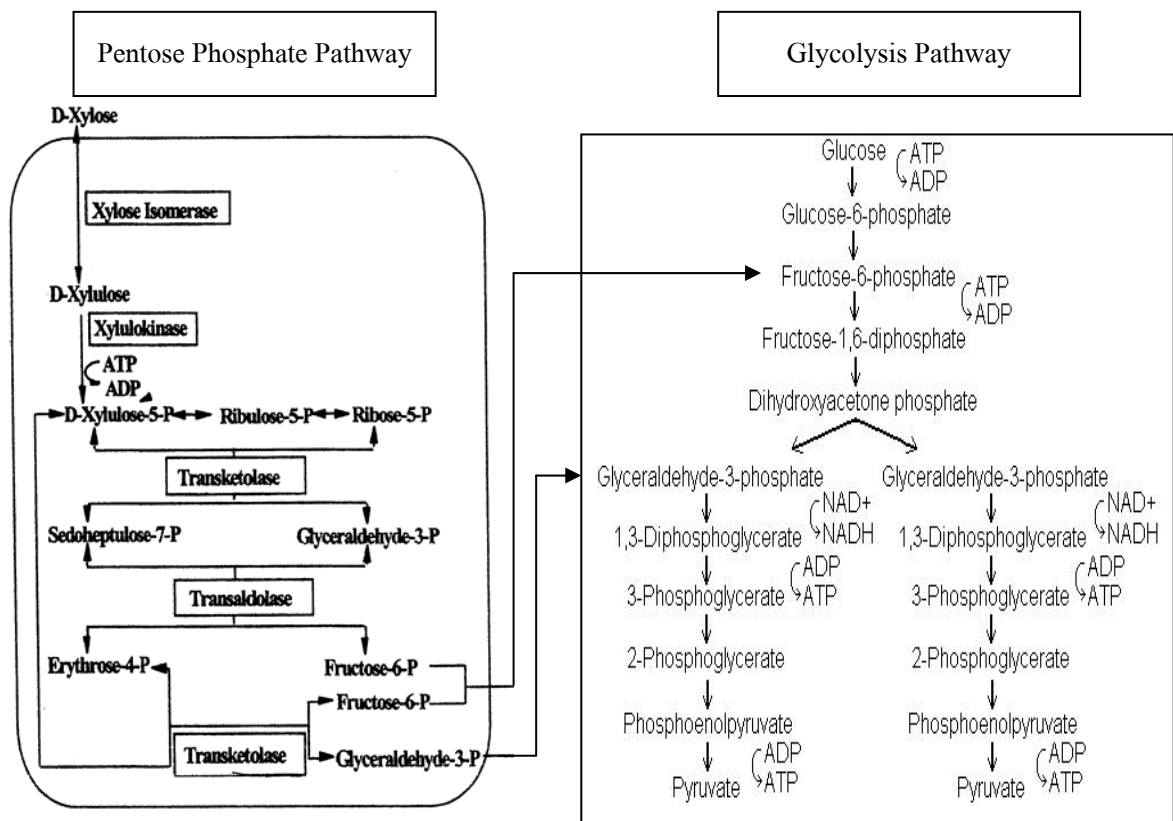
น้ำตาลไซโลสเป็นน้ำตาล 5 คาร์บอน ซึ่งจุลินทรีย์ไม่สามารถเปลี่ยนใช้เป็นพลังงานได้โดยตรง จึงจำเป็นต้องเปลี่ยนน้ำตาลไซโลสเป็นไซลูโลส-5-ฟอสเฟต (xylulose-5-phosphate, X5P) หลังจากนั้น X5P จึงเข้าสู่วิธีเพนโตสฟอสเฟต (pentose phosphate pathway, PPP) และเข้าสู่กระบวนการไกลโคไลซิสเพื่อให้ได้พลังงาน ใช้ในการเจริญ และสร้างสารต่างๆด้วย

ในยีสต์ที่หมักน้ำตาลไซโลสได้ส่วนใหญ่ น้ำตาลไซโลสถูกเปลี่ยนเป็นไซลิตอลด้วยเอนไซม์ไซโลสรีดักเตส (xylose reductase, XR) จากนั้นไซลิตอลถูกเปลี่ยนเป็นดีไซลูโลส (D-xylulose) ด้วยเอนไซม์ไซลิตอลดีไฮโดรจีเนส (xylitol dehydrogenase, XDH) และมีการเติมหมู่ฟอสเฟต (phosphate) โดยเอนไซม์ไซลูโลไคเนส (xylulokinase) ได้ไซลูโลส-5-ฟอสเฟต (xylulose-5-phosphate, X5P) หลังจากนั้น X5P จึงเข้าสู่วิธีเพนโตสฟอสเฟต (Hahn-Hagerdal และคณะ, 2007) ในส่วนของแบคทีเรียไซโลสถูกเมตาบอไลต์ไปเป็นไซลูโลส (xylulose) ในหนึ่งขั้นตอนโดยเอนไซม์ไอโซเมอเรส (isomerase) (Vongsuvanlert และ Tani, 1988) (รูปที่ 2.9)



รูปที่ 2.9 กระบวนการเปลี่ยนน้ำตาลไซโลสเป็นไซลูลอสของเชื้อจุลินทรีย์
(Hahn-Hagerdal และคณะ, 2007)

เมื่อน้ำตาลไซโลสถูกเปลี่ยนเป็น ดี-ไซลูลอส-5-ฟอสเฟส (D-Xylulose-5-phosphate, D-X5P) D-X5P มีการเคลื่อนย้ายคาร์บอนสองตัวจาก D-X5P ไปยังดี-ไรโบส-5-ฟอสเฟต (D-Ribose-5-phosphate, D-R5P) กลายเป็น D-Sedoheptulose-7-phosphate (ซึ่งมีเจ็ดคาร์บอน) และ D-Glyceraldehyde-3-phosphate (มีสามคาร์บอน) ตามลำดับ โดยใช้เอนไซม์ Transketolase จากนั้นคาร์บอนสามตัวจะถูกโอนย้ายจาก D-Sedoheptulose-7-phosphate ไปยัง Glyceraldehyde-3-phosphate ซึ่งมีสามคาร์บอนกลายเป็น D-Fructose-6-phosphate (ซึ่งมีหกคาร์บอน) และ D-Erythrose-4-phosphate (มีสี่คาร์บอน) ซึ่ง D-Erythrose-4-phosphate (มีสี่คาร์บอน) จะรวมตัวกับ D-Xylulose-5-phosphate จะเร่งปฏิกิริยาด้วยเอนไซม์ Transketolase กลายเป็น D-Fructose-6-phosphate และ Glyceraldehyde-3-phosphate ซึ่ง Fructose-6-phosphate และ Glyceraldehyde-3-phosphate จะเข้าสู่วัฏจักรไกลโคไลซิส (Glycolysis Pathway) (รูปที่ 2.10) (David และ Michael, 2004)



รูปที่ 2.10 การหมักน้ำตาลไซโลสด้วยวิธีเพนโตสฟอสเฟตและเข้าสู่วิถีไกลโคไลซิส

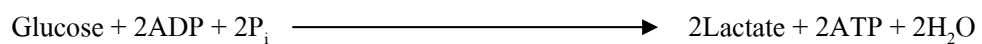
(Mohagheghi และคณะ, 2014)

2.3.2 วิถีไกลโคไลซิส (Glycolysis)

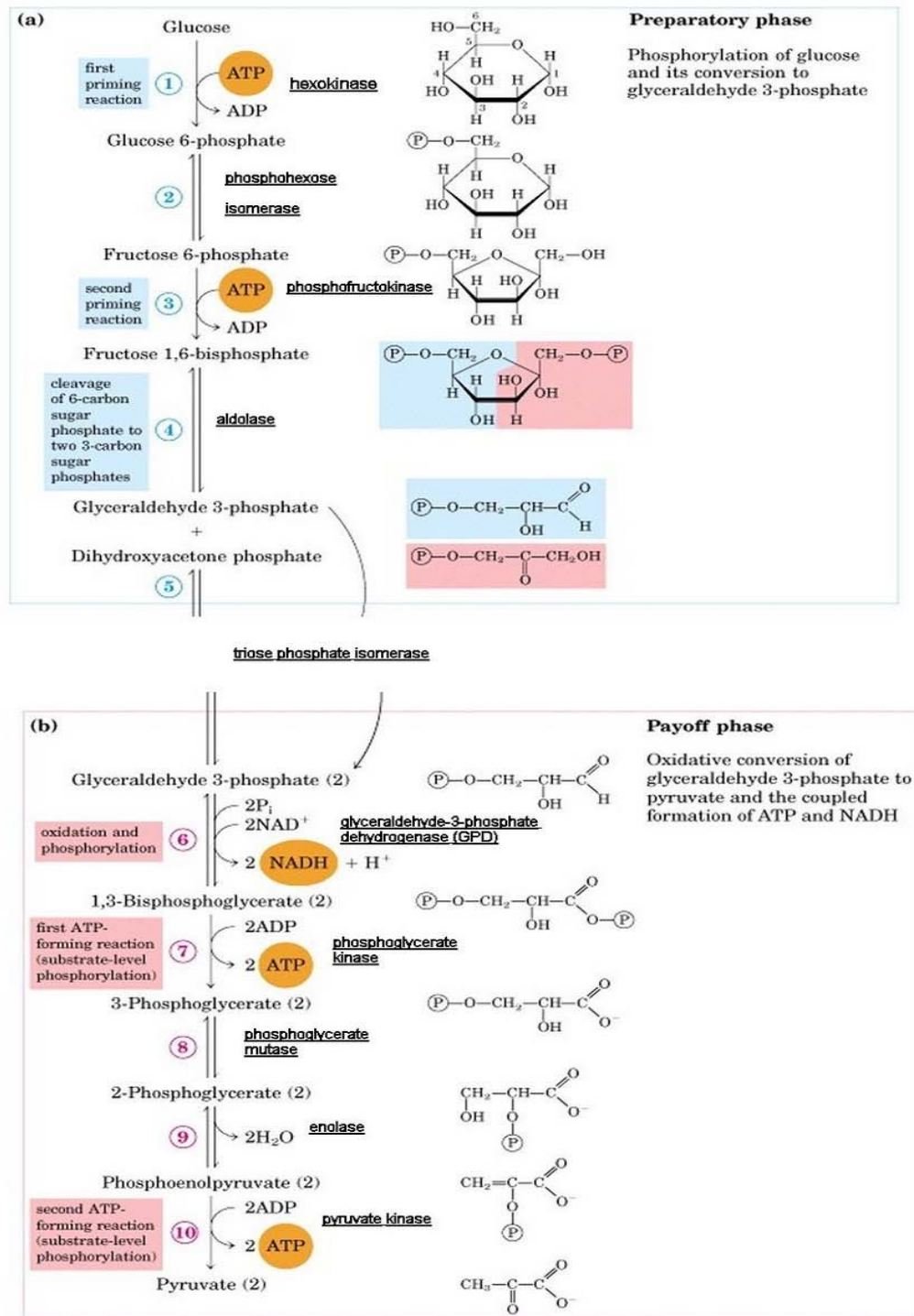
ไกลโคไลซิส (Glycolysis) หรือขบวนการเผาผลาญกลูโคส ในขบวนการนี้กลูโคสจะถูกเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์หลายประเภทขึ้นอยู่กับสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด เช่น ในเซลล์กล้ามเนื้อเนื้อจะเปลี่ยนกลูโคสเป็นกรดแลคติกในสภาวะที่ขาดออกซิเจน เรียกกระบวนการนี้ว่า Homolactic fermentation ส่วนในการหมักสุรา (Alcoholic fermentation) กลูโคสจะถูกเปลี่ยนเป็นเอทานอล และกระบวนการหายใจแบบใช้ออกซิเจน (Aerobic oxidation) จะได้กรดอินทรีย์ต่างรวมถึงกรดมาลิกด้วย ซึ่งเกิดในวัฏจักรเครบส์ (Kreb's cycle or Tricarboxylic acid cycle)

ไกลโคไลซิส หรือ EMP Pathway เป็นกระบวนการสลายกลูโคส (6C) ให้เป็นกรดไพรูวิก (3C) เกิดขึ้นในส่วนไซโทพลาซึม (ไซโทพลาสซึม) ของเซลล์ (รูปที่ 11) ในปฏิกิริยาที่ 1 เป็นปฏิกิริยาฟอสฟอริเลชันของกลูโคสให้กลายเป็น Glucose-6-phosphate (G6P) โดยรับพลังงานจาก ATP ปฏิกิริยานี้เป็นปฏิกิริยาที่ไม่ทวนกลับ (Irreversible) ปฏิกิริยาที่ 2 เป็นปฏิกิริยาการเปลี่ยน G6P เป็น

Fructose –6- phosphate (F6P) ปฏิกิริยานี้ทวนกลับได้ (Reversible) จากนั้น F6P จะถูกฟอสฟอริเลท กลายเป็น Fructose - 1,6 - diphosphate (FDP) ในปฏิกิริยาที่ 3 ซึ่งเป็นปฏิกิริยาไม่ทวนกลับ ในปฏิกิริยาที่ 4 FDP จะแตกตัวเป็น C3 สองตัวคือ Hydroxyacetone phosphate (DHAP) กับ Glyceraldehyde –3- phosphate (GAP) และปฏิกิริยาสุดท้ายของตอนที่ 1 นี้ (ปฏิกิริยาที่ 5) คือปฏิกิริยา ไอโซเมอไรเซชัน (Isomerization) ระหว่าง DHAP กับ GAP ในตอนที่ 2 เริ่มด้วยปฏิกิริยาออกซิเดชัน ของ GAP โดย NAD^+ ให้กลายเป็น 1,3 - Diphosphoglycerate (DPG) ให้ NADH เกิดในปฏิกิริยาที่ 6 จากนั้นในปฏิกิริยาที่ 7 DPG จะให้ฟอสเฟตแก่ ADP ได้ 3-Phosphoglycerate (3PGA) กับ ATP ปฏิกิริยานี้เป็นปฏิกิริยาไม่ทวนกลับและเป็นปฏิกิริยาแรกในไกลโคไลซิสที่ให้พลังงาน ATP จากนั้น ในปฏิกิริยาที่ 8 3PGA เปลี่ยนเป็น 2-Phosphoglycerate (2PGA) ต่อด้วยปฏิกิริยาที่ 9 2PGA เปลี่ยนเป็น 2-Phosphoenolpyruvate (PEP) ปฏิกิริยาที่ 10 PEP ให้ฟอสเฟตแก่ ADP เพื่อสร้าง ATP แล้วกลายเป็นไพรูเวท (Pyruvate) เป็นปฏิกิริยาที่สองที่ให้ ATP แล้วไพรูเวทจะถูกรีดิวซ์โดย NADH ดังนั้นในวิถีไกลโคไลซิสนี้ได้พลังงาน 2ATP ต่อหนึ่งโมเลกุลของกลูโคสดังนี้



และ ATP ที่ได้จากปฏิกิริยาทั้งสอง เกิดขึ้นขณะสับเตอท์มีการเปลี่ยนแปลงโดยตรงจึงเรียกว่า Substrate-level phosphorylation (David และ Michael, 2004)

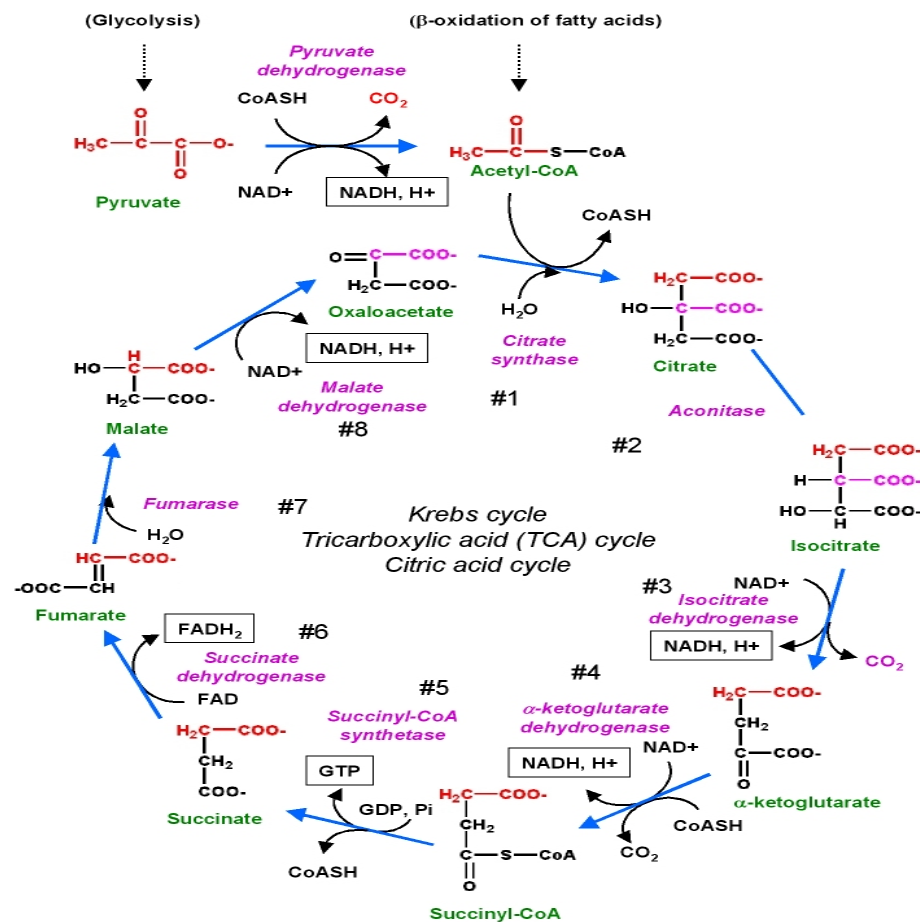


รูปที่ 2.11 กระบวนการไกลโคไลซิส ซึ่งประกอบด้วยปฏิกิริยาย่อย 10 ขั้นตอน แต่ละขั้นตอนถูกเร่งด้วยปฏิกิริยาไกลโคไลติกเอนไซม์ (glycolytic enzyme) 10 ชนิด (Soroka, 2013)

2.3.3 วัฏจักรเครบส์ (Kreb's cycle or Tricarboxylic acid cycle)

วัฏจักรเครบส์หรือวัฏจักรกรดซิตริก มีการเริ่มต้นจากไพรูเวตถูกออกซิไดส์ได้คาร์บอนไดออกไซด์ 1 โมเลกุล และได้สารที่มีหมู่แอซิติล (acetyl group) อีก 1 โมเลกุล ซึ่งทำปฏิกิริยากับโคเอนไซม์เอ (coenzyme A, CoA) ได้เป็นแอซิติล-โคเอ และเข้าสู่วัฏจักรเครบส์โดยวัฏจักรเครบส์เริ่มต้น (รูปที่ 2.12) ปฏิกิริยาที่ 1 Acetyl CoA (มีสองคาร์บอน) เข้ารวมตัวกับกรด Oxaloacetic (มีสี่คาร์บอน) ได้เป็นกรด Citric acid (มีหกคาร์บอน) ปฏิกิริยาที่ 2 กรด Citric มีการสูญเสียน้ำกลายเป็น กรด Cis - aconitic (มีหกคาร์บอน) แล้วเปลี่ยนเป็นกรด Isocitric (มีหกคาร์บอน) ปฏิกิริยาที่ 3 กรด Isocitric จะมีการสูญเสีย $2H^+$ ได้เป็นกรด α - ketoglutaric (มีห้าคาร์บอน) และก๊าซ CO_2 โดย H^+ จะมีสาร $NADH^+$ มารับกลายเป็น $NADH+H^+$ ปฏิกิริยาที่ 4 กรด α - ketoglutaric (มีห้าคาร์บอน) จะถูกออกซิไดส์ได้ Succinyl CoA (มีสี่คาร์บอน) และก๊าซ CO_2 ปฏิกิริยาที่ 5 Succinyl CoA (มีสี่คาร์บอน) เป็นสารพลังงานสูงจะแตกตัวเป็นกรด Succinic (มีสี่คาร์บอน) และมีการปล่อยพลังงาน GTP ออกมาแล้วเปลี่ยนเป็น ATP ปฏิกิริยาที่ 6 กรด Succinic (มีสี่คาร์บอน) จะมีการสูญเสีย $2H^+$ ได้กรด Fumaric (4 คาร์บอน) ส่วน $2H^+$ จะมี FAD มารับกลายเป็น $FADH_2$ ปฏิกิริยาที่ 7 กรด Fumaric จะถูกไฮโดรไลต์เป็นกรด Malic (มีสี่คาร์บอน) ปฏิกิริยาที่ 8 กรด Malic (มีสี่คาร์บอน) มีการสูญเสีย $2H^+$ ให้ NAD^+ กลายเป็นกรด Oxaloacetic กลับคืนมาพร้อมที่จะเริ่มต้นของวัฏจักรเครบส์ต่อไป (Garrett และ Charles, 2008)

วัฏจักรเครบส์ประกอบด้วย 8 ปฏิกิริยา มีเอนไซม์ที่ใช้ในการเร่งแตกต่างกัน โดยปฏิกิริยาที่ 3, 4, 6 และ 8 เป็นปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Oxidation reaction) ซึ่งปฏิกิริยาที่ 3, 4, 6 และ 8 มี NAD^+ เป็นตัวออกซิไดซ์ ส่วนปฏิกิริยาที่ 6 ใช้ FAD เป็นตัวออกซิไดซ์ สำหรับปฏิกิริยาที่ 5 มีการเติมหมู่ฟอสเฟต (ฟอสฟอไรเซชัน) (Phosphorylation) ให้กับ GDP (กัวโนซีนไดฟอสเฟต) (Guanosine diphosphate) ทำให้เกิดสารพลังงานสูง คือ GTP ขึ้น 1 โมเลกุล ซึ่งปฏิกิริยานี้จะเทียบได้กับปฏิกิริยาการสร้าง ATP เนื่องจากการย้ายหมู่ฟอสเฟตนี้ไปให้กับ ADP นี้เกิดขึ้นได้ง่ายทำให้เกิด ATP ขึ้น (Garrett และ Charles, 2008)



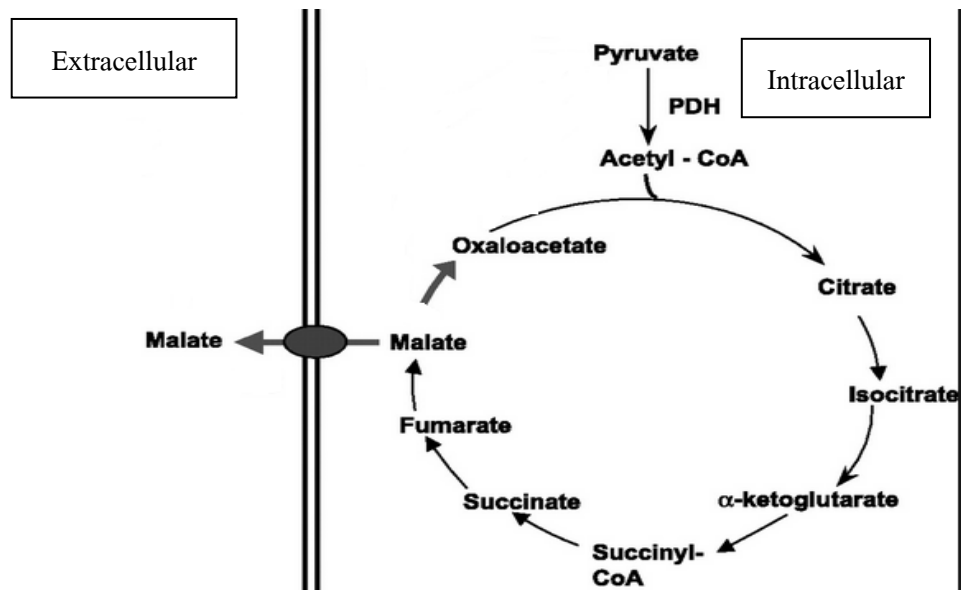
รูปที่ 2.12 วัฏจักรเครบส์ (Krebs cycle or Tricarboxylic acid cycle)

(Garrett และ Charles, 2008)

2.3.3.1 การผลิตกรดมาลิกจากวัฏจักรเครบส์

กรดมาลิกสามารถผลิตได้จากวัฏจักรเครบส์เนื่องจากกรดมาลิกเป็นสารตัวกลางที่อยู่ในวัฏจักรเครบส์และสามารถผลิตได้โดยวิธีต่างๆ ดังนี้

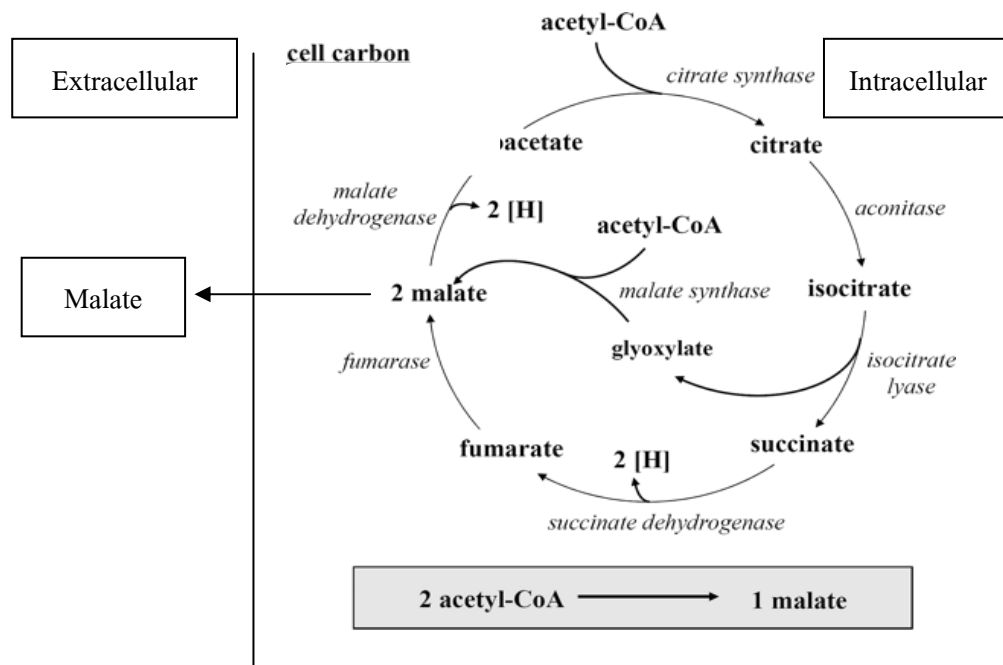
วิธีที่ 1 เกิดการรวมตัวของออกซาโลแอซีเทตกับแอซีทิล-โคเอเป็นกรดซิตริก ต่อมาเปลี่ยนเป็นสารตัวกลางชนิดอื่นๆ ตามวัฏจักรเครบส์จนกระทั่งได้เป็นมาเลต จากนั้นมาเลตที่เกิดขึ้นจะถูกส่งออกสู่ของเหลวภายในเซลล์ และส่วนหนึ่งเปลี่ยนเป็นออกซาโลแอซีเทตกลับคืนมาพร้อมที่จะเริ่มต้นของวัฏจักรเครบส์ต่อไป รูปที่ 2.13 (Christoph Knuf, 2014)



รูปที่ 2.13 การผลิตกรดมาลิกตามวัฏจักรเครบส์

(Jensen และคณะ, 2008)

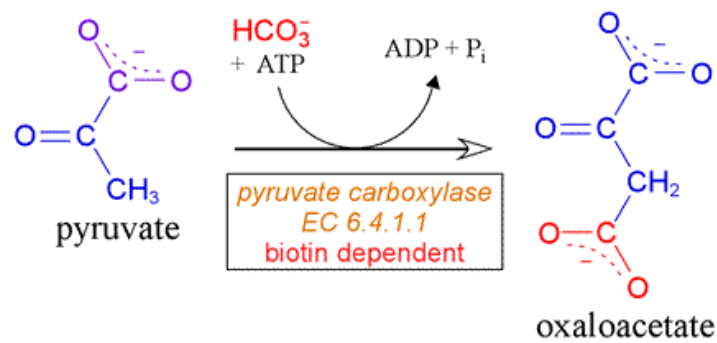
วิธีที่ 2 การสร้างมาเลตเกิดจากการรวมตัวของแอซีทิล-โคเอ 2 โมเลกุล โดยผ่าน glyoxylate cycle ซึ่ง เป็นวิธีการออกซิเดชันทางเลือกของการผลิตมาเลตอีกทางหนึ่ง รูปที่ 2.14 (Christoph Knuf, 2014)



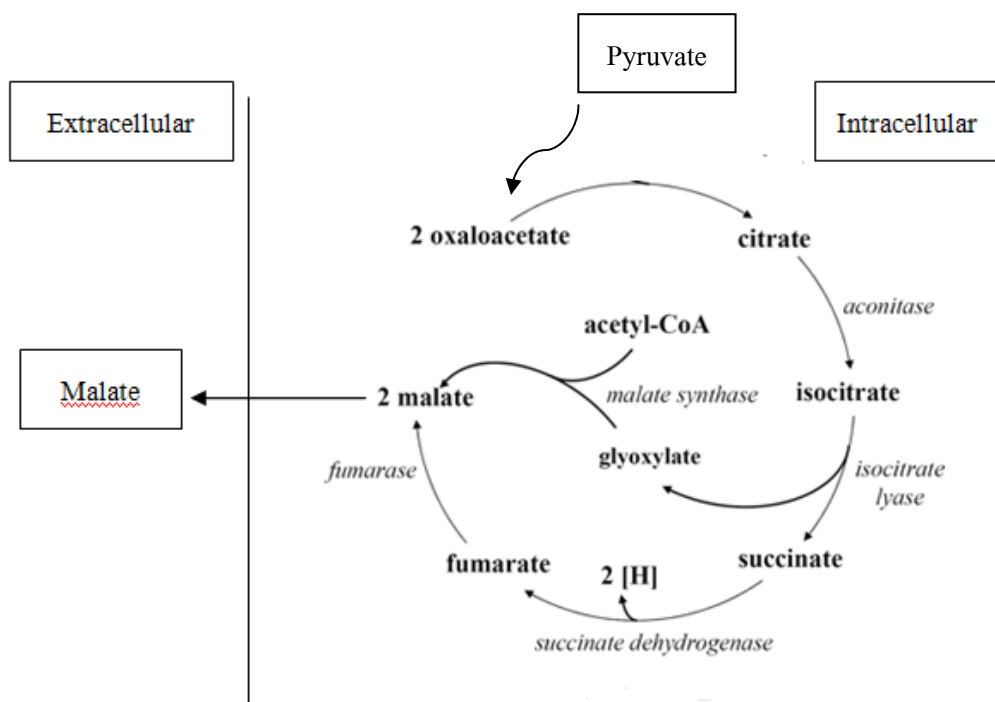
รูปที่ 2.14 การรวมตัวของแอซีทิล-โคเอ 2 โมเลกุลโดยผ่าน glyoxylate cycle เพื่อผลิตมาเลต

(Erb และคณะ, 2004)

วิธีที่ 3 การสร้างมาเลตเกิดจากกระบวนการ glyoxylate cycle เป็นแบบไม่เต็มวง (non cyclic pathway) (รูปที่ 2.15) แต่ออกซาโลแอซีเทตจะถูกสร้างจากปฏิกิริยาไพรูเวตคาร์บอกซิเลชัน (pyruvate decarboxylation) (รูปที่ 2.16) (Christoph Knuf, 2014)

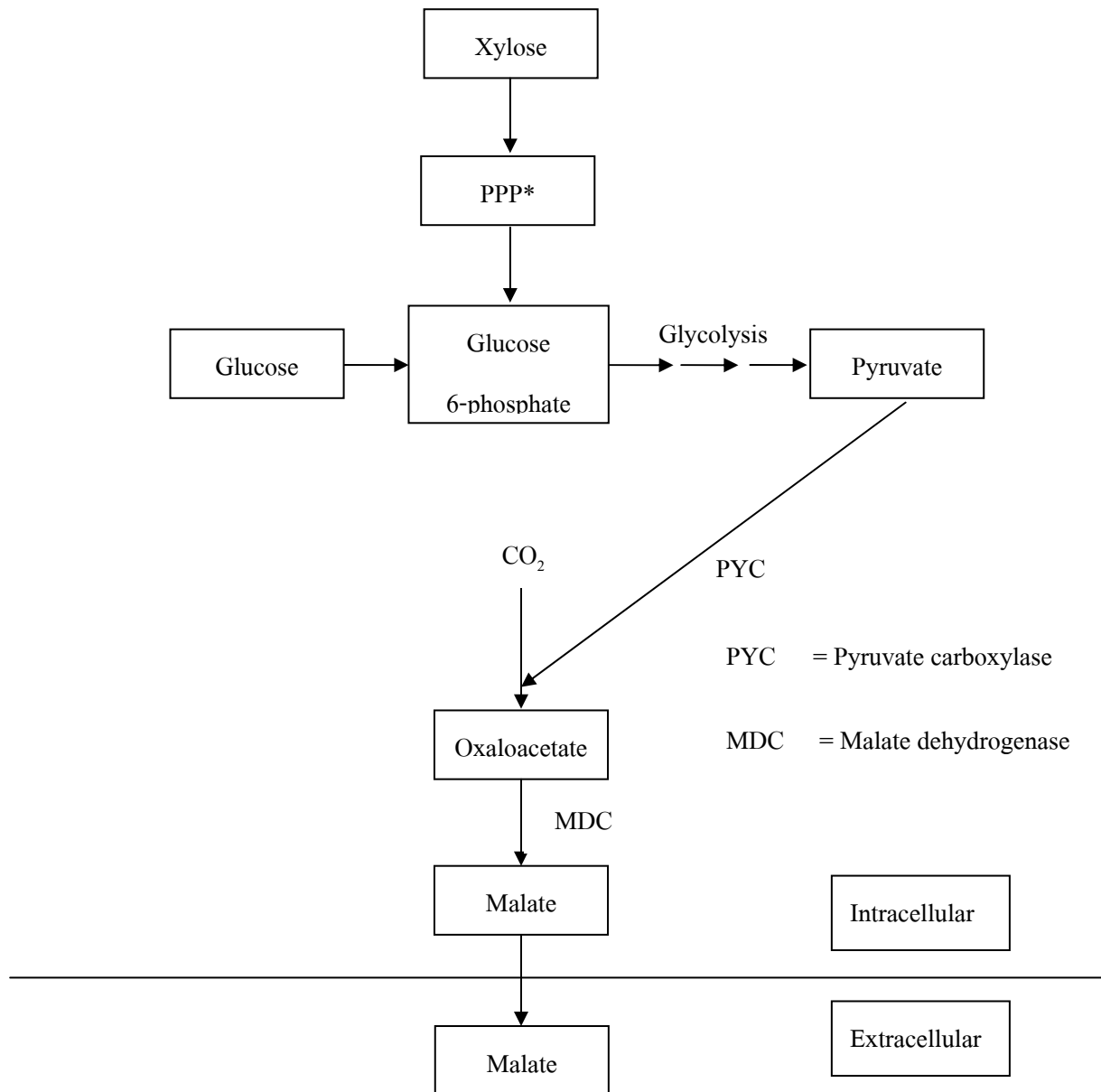


รูปที่ 2.15 ออกซาโลแอซีเทตจะถูกสร้างจากปฏิกิริยาไพรูเวตคาร์บอกซิเลชัน (pyruvate decarboxylation) (Zella และคณะ, 2008)



รูปที่ 2.16 การสร้างมาเลตเกิดจากกระบวนการ glyoxylate cycle แต่เป็นแบบไม่เต็มวง (non cyclic pathway) (Erb และคณะ, 2004)

วิธีที่ 4 การสร้างมาเลตเกิดจากปฏิกิริยาคาร์บอกซิเลชันของไพรูเวต โดย biotin-dependent pyruvate carboxylase โดยในปฏิกิริยาคาร์บอนไดออกไซด์เพื่อช่วยทำงานในปฏิกิริยา pyruvate carboxylase เพื่อเปลี่ยนไปเป็นออกซาโลแอซีเตต ต่อมาเกิดปฏิกิริยารีดักชันของออกซาโลแอซีเตตได้เป็นมาเลต (รูปที่ 2.17) (Christoph Knuf, 2014)



รูปที่ 2.17 เกิดปฏิกิริยารีดักชันของออกซาโลแอซีเตตได้เป็นมาเลต

(Goldberg และคณะ, 2006)

2.4 จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตกรดมาลิก

Aspergillus flavus เป็นจุลินทรีย์ชนิดแรกที่สามารถผลิตกรดมาลิกได้ โดยมีการศึกษาการหมักกรดมาลิกโดยเชื้อ *A. flavus* ประกอบด้วย 2 ระยะ คือ ระยะการเจริญเติบโตและระยะการผลิตกรด ในระยะที่ 2 กลูโคสส่วนมากจะถูกเปลี่ยนเป็นกรดมาลิก กรดซักซินิกเป็นผลผลิตที่ได้เป็นจำนวนมากอันดับ 2 ตามด้วยกรดฟูมาริก จากการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดทำให้พบว่า *A. flavus* จะสร้างผลึกในระยะผลิตกรดมาลิก จำนวนผลึกจะสร้างบนเส้นใยของรา และเจริญเป็นเพลเลต (pellets) ขนาดและจำนวนของผลึกจะเพิ่มขึ้นในระหว่างที่มีการหมักพร้อมกับการสะสมกรดมาลิก ผลึกประกอบด้วยแคลเซียมมาเลต (calcium malate) และมีแคลเซียมซักซิเนต (calcium succinate), แคลเซียมฟูมาเรต (calcium fumarate) จำนวนเล็กน้อย ในวันที่ 5 ของการหมัก มีปริมาณกรดมาลิกประมาณร้อยละ 9 ที่อยู่ในรูปผลึก ซึ่งเชื้อ *A. flavus* ขับกรดจากเส้นใยออกมาสู่อาหารเลี้ยงเชื้อ การขับออกมาอย่างรวดเร็วทำให้กรดทำปฏิกิริยากับแคลเซียมคาร์บอเนตที่มีในอาหารได้เกลือแคลเซียมที่ไม่ละลายน้ำเป็นผลึกอยู่บนเส้นใย (Abe และคณะ, 1962 ; Peleg และคณะ, 1988 ; Battle และคณะ, 1991)

นอกจากนี้ยังมีรายงานอื่นๆมากมายที่นำไปผลิตกรดมาลิกเป็นจำนวนมาก เช่น *Aspergillus flavus* , *Rhizopus arrhizus* , *Paecilomyces varioti*, *Monascus araneosus*, และ *Schizophyllum commune* เป็นต้น (ตารางที่ 2.5)

ตารางที่ 2.5 การผลิตกรดมาลิกจากเชื้อราโดยกระบวนการหมัก (Zella และคณะ, 2008)

Microorganism	Malic acid (g/L)	Productivity (g/L/h)	reference
<i>Aspergillus flavus</i>	60	0.1	Abe และคณะ, 1962
	36	0.19	Peleg และคณะ, 1988
	113	0.59	Battle และคณะ, 1991
<i>Rhizopus arrhizus</i> และ <i>Paecilomyces varioti</i>	48	0.34	Takao และคณะ, 1983
<i>Schizophyllum commune</i>	18	0.16	Kawagoe และคณะ, 1997

การผลิตกรดมาลิกในกระบวนการทางอุตสาหกรรมจำนวนมากเป็นการผลิตแบบต่อเนื่องจากกรดฟูมาริกโดยใช้เอนไซม์ fumarase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาเพื่อย่อยกรดฟูมาริกเปลี่ยนไปเป็นกรดมาลิก เทคนิคที่สำคัญที่สุดคือการตรึงเซลล์ของเชื้อ *Brevibacterium ammoniagenes* หรือเชื้อ *B. flavum* ซึ่งผลิตเอนไซม์ fumarase ที่มีกิจกรรมสูง

Yamamoto และคณะ (1976) ได้ทำการทดลองผลิตแอล-กรดมาลิก (L-malic acid) แบบต่อเนื่องจากกรดฟูมาริก โดยเชื้อ *B. ammoniagenes* IAM 1645 และจากจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ที่ถูกตรึงในพอลิอะคริลาไมด์เจล แสดงกิจกรรมเอนไซม์ fumarase ของแบคทีเรียชนิดต่างๆ ที่ถูกตรึงในพอลิอะคริลาไมด์ โดยเชื้อ *B. ammoniagenes* IAM 1645 มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุดทั้งในปฏิกิริยาที่มีและไม่มี cetylpyridinium chloride (CPC) ผสมอยู่ (ตารางที่ 2.6) โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับกิจกรรมของเอนไซม์ fumarase คือ 60 องศาเซลเซียส และ pH ที่เหมาะสมมีช่วงกว้างคือ 6.5-8.0 แต่ในผลิตภัณฑ์มีผลผลิตพลอยได้ที่ไม่ต้องการคือกรดซักซินิก ดังนั้นการเลี้ยงเซลล์ที่ทรีต (treat) ด้วยน้ำดี ที่มีความเข้มข้นเหมาะสมร้อยละ 0.3 เพื่อยับยั้งการผลิตกรดซักซินิก เพื่อส่งเสริมอัตราการสร้างกรดมาลิก

ตารางที่ 2.6 ปริมาณกรดมาลิกของเซลล์จุลินทรีย์ที่ถูกตรึงในพอลิอะคริลาไมด์เจล (Yamamoto และคณะ, 1976)

จุลินทรีย์	การสร้างกรดมาลิก (L-malic acid) (โมล/ชั่วโมง/กรัมเซลล์)	
	ไม่เติม CPC	เติม CPC ^a
<i>Brevibacterium ammoniagenes</i> IAM 1645	0.49	3.37
<i>Corynebacterium qui</i> IAM 1038	0.09	0.42
<i>Escherichia coli</i> ATCC 11303	0.27	0.32
<i>Microbacterium flavum</i> IAM 1642	0.20	0.48

CPC : Cetylpyridinium chloride

CPC^a : เติม Cetylpyridinium chloride ที่ความเข้มข้น 0.02 เปอร์เซ็นต์

2.4.1 จุลินทรีย์สายพันธุ์ต่างๆที่สามารถผลิตกรดโพลีมาลิกและกรดมาลิกในกระบวนการหมัก

ตารางที่ 2.7 จุลินทรีย์สายพันธุ์ต่างๆที่สามารถผลิตโพลีมาลิกและกรดมาลิกในกระบวนการหมัก (Zou และคณะ, 2011)

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

*PMA = Polymalic acid; [PMA] (g/L) = 0.87 x [malic acid] (g/L)

2.4.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องสำหรับการผลิตกรดมาลิกจากทางชีวภาพ

Khan และคณะ (2013) รายงานว่า *Penicillium viticola* 152 ผลิตแคลเซียมมาเลทได้สูงสุดเท่ากับ 132 กรัม/ลิตร เมื่อใช้น้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น 140 กรัม/ลิตร และเติมแคลเซียมคาร์บอเนต 40 กรัม/ลิตร โดยเปลี่ยนแหล่งไนโตรเจนเป็น corn steep liquor ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 ปริมาตร/ปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ความเร็ว 180 รอบ/วินาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง เมื่อนำ *P. viticola* 152 มาผลิตในถังหมักขนาด 10 ลิตร โดยใช้สภาวะตามข้างต้น พบว่าสามารถผลิตแคลเซียมมาเลท 168 กรัม/ลิตร มีค่าผลได้เท่ากับ 1.288 กรัม/กรัมน้ำตาลกลูโคส ค่ากำลังการผลิตเท่ากับ 1.75 กรัม/ลิตร/ชั่วโมง

Leathers และ Manitchotpisit (2013) รายงานว่า *Physarum polycephalum* strain NRRL 50383 ผลิตกรดโพลีมาลิก (PMA) สูงสุดเท่ากับ 18.8 กรัม/ลิตร โดยเลี้ยงในน้ำตาลกลูโคสร้อยละ 5 น้ำหนัก/ปริมาตรและเติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 3 น้ำหนัก/ปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบ/วินาที เป็นเวลา 7 วัน และสามารถผลิต PMA จากซังข้าวโพด และ ฟางข้าวสาลี ที่ผ่านการปรับสภาพด้วย H_2O_2 โดยเติมเอนไซม์ทางการค้าคือ Celluclast 1.5 L, Novozyme 188 และ FibreZyme LBR ลงในซังข้าวโพด และ ฟางข้าวสาลี และเติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 3 น้ำหนัก/ปริมาตร บ่มที่สภาวะเดียวกับข้างต้น พบว่าสามารถผลิต PMA จากซังข้าวโพด และจากฟางข้าวสาลี เท่ากับ 10.1 และ 23.5 กรัม/ลิตร ตามลำดับ

Ma และคณะ (2013) รายงานว่า *Aureobasidium* sp. P6 สามารถผลิตกรดโพลีมาลิก (PMA) ได้สูงสุดได้ 100.7 กรัม/ลิตร เมื่อใช้น้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น 140 กรัม/ลิตร เติมแคลเซียมคาร์บอเนต 65 กรัม/ลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ความเร็ว 180 รอบ/วินาที เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นนำมาเลี้ยงในถังหมักขนาด 10 ลิตร โดยใช้น้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น 120 กรัม/ลิตร และ 140 กรัม/ลิตร เติมแคลเซียมคาร์บอเนต 65 กรัม/ลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ความเร็ว 300 รอบ/วินาที เป็นเวลา 7 วัน พบว่า สามารถผลิต PMA เมื่อใช้น้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น 120 กรัม/ลิตร เท่ากับ 98.7 กรัม/ลิตร และมีค่าผลได้เท่ากับ 0.85 กรัม/กรัมน้ำตาลกลูโคส ค่ากำลังการผลิตเท่ากับ 0.63 กรัม/ลิตร/ชั่วโมง และสามารถผลิต PMA จากน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น 140 กรัม/ลิตรเท่ากับ 118 กรัม/ลิตร มีค่าผลได้เท่ากับ 0.87 กรัม/กรัมน้ำตาลกลูโคส ค่ากำลังการผลิตเท่ากับ 0.67 กรัม/ลิตร/ชั่วโมง

Wang และคณะ (2013) รายงานว่า *Penicillium sclerotiorum* K302 ผลิตแคลเซียมมาลิกได้สูงสุด 88.6 กรัม/ลิตร มีค่าผลได้เท่ากับ 0.81 กรัม/กรัมน้ำตาลกลูโคส ค่ากำลังการผลิตเท่ากับ 1.23 กรัม/ลิตร/

ชั่วโมง โดยใช้ น้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น 140 กรัม/ลิตร และเติมแคลเซียมคาร์บอเนต 50 กรัม/ลิตร โดยบ่ม ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ความเร็ว 300 รอบ/วินาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง และเมื่อนำ *P. sclerotiorum* K302 มาผลิตในถังหมักขนาด 10 ลิตร โดยใช้สภาวะตามข้างต้น พบว่าผลิตกรดมาลิก ได้ 92 กรัม/ลิตร มีค่าผลได้เท่ากับ 0.88 กรัม/กรัม น้ำตาลกลูโคส ค่ากำลังการผลิตเท่ากับ 1.23 กรัม/ลิตร/ชั่วโมง แต่ใช้เวลาสั้นกว่าคือ 72 ชั่วโมง

Zou และคณะ (2013) รายงานว่า *A. pullulans* strain ZX – 10 สามารถผลิตกรดโพลิมาลิก (PMA) ได้ สูงสุดเท่ากับ 87.6 กรัม/ลิตร และมีค่ากำลังการผลิตเท่ากับ 0.61 กรัม/ลิตร/ชั่วโมง ในถังหมักขนาด 5 ลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 500 รอบ/วินาที เป็นเวลา 120 ชั่วโมง และเมื่อนำ เซลล์มาทำการตรึงในถังหมักชนิด Fibrous – bed พบว่าสามารถผลิตกรดโพลิมาลิกได้สูงกว่าการหมัก ธรรมดาเท่ากับ 144.2 กรัม/ลิตร มีค่ากำลังการผลิตเท่ากับ 0.74 กรัม/ลิตร/ชั่วโมง และ PMA

Zhang และคณะ (2011) รายงานว่า *A. pullulans* คัดแยกได้จากเศษพืชและนำมาศึกษาสภาวะที่ เหมาะสมในการผลิตกรดโพลิมาลิก (PMA) โดยบ่มที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบ/วินาที เป็นเวลา 7 วัน ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนแต่ละชนิดเท่ากับ 120 กรัม/ลิตร และเติม แคลเซียมคาร์บอเนต 30 กรัม/ลิตร พบว่าแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน กรดอินทรีย์ที่เหมาะสมคือ น้ำตาลกลูโคส แอมโมเนียไนเตรท และ กรดฟูมาลิก สามารถผลิตกรดมาลิกเท่ากับ 53.65, 50.75 และ 62.27 กรัม/ลิตร เมื่อนำ *A. pullulans* มาผลิตในถังหมักขนาด 10 ลิตร โดยใช้กลูโคสที่ความ เข้มข้น 120 กรัม/ลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจนคือ แอมโมเนียไนเตรท และเติมกรด ฟูมาลิก 5 กรัม/ลิตร บ่มที่สภาวะตามข้างต้น พบว่าสามารถผลิตกรดมาลิก 57.2 กรัม/ลิตรค่ากำลัง การผลิตเท่ากับ 0.35 กรัม/ลิตร/ชั่วโมง

Holler และ Lee (1999) ได้ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดโพลิมาลิก (PMA) ของเชื้อ *P. polycephalum* พบว่าเมื่อเลี้ยง *P. polycephalum* ในอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคสร้อยละ 1 น้ำหนัก/ ปริมาตร เติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 1 น้ำหนัก/ปริมาตร และเติม bactotryptone ร้อยละ 1 น้ำหนัก/ปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิ 24 องศาเซลเซียส ความเร็ว 150 รอบ/วินาที เป็นเวลา 3 วัน พบว่า สามารถผลิตกรดมาลิกเท่ากับ 1.7 กรัม PMA/ลิตร และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสเป็น ร้อยละ 4.5 น้ำหนัก/ปริมาตร สามารถผลิตกรดโพลิมาลิกได้สูงสุดเท่ากับ 2.7 กรัม PMA/ลิตร ที่เวลา 6 วัน และค่าพีเอชที่เหมาะสมเท่ากับ 6.0

2.5 ข้อดีและข้อเสียในการผลิตกรดมาลิกด้วยวิธีทางเคมีและทางชีวภาพ

ในกระบวนการผลิตกรดมาลิกนั้นสามารถกระทำได้ 2 วิธีคือ ทางเคมีและทางชีวภาพ ซึ่งจะมีข้อดีและข้อเสียแตกต่างกัน ดังตารางที่ 2.8

ตารางที่ 2.8 ข้อดีและข้อเสียสำหรับการผลิตกรดมาลิกด้วยวิธีทางเคมีและทางชีวภาพ (Kajiyama และคณะ 2003;Ma และคณะ, 2013;Vert, 1998)

วิธีทางเคมี	วิธีทางชีวภาพ
ข้อดี 1. ใช้เวลาสั้นในการผลิต 2. ได้ผลิตภัณฑ์ (กรดมาลิก) จำนวนมาก	ข้อดี 1. สับสเตรทที่ใช้เป็นสารตั้งต้นมีราคาถูก เช่น น้ำตาลจากชีวมวล 2. ปฏิกริยาที่ใช้ไม่รุนแรง 3. ใช้เวลาน้อยในการทำให้กรดมาลิกบริสุทธิ์ เนื่องจากจุลินทรีย์สามารถเปลี่ยนเป็นกรดมาลิกได้โดยตรง 4. เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม
ข้อเสีย 1. สับสเตรทที่ใช้ เช่น ฟูมาลิก มาเลอิก เป็นสารตั้งต้นที่มีราคาแพง 2. ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีความบริสุทธิ์ต่ำจึงต้องอาศัยหลายขั้นตอนในการทำให้กรดมาลิกบริสุทธิ์ 3. ปฏิกริยาที่ใช้รุนแรง 4. ทำลายสิ่งแวดล้อม	ข้อเสีย 1. ใช้เวลานานในการผลิต วิธีแก้ไข 1. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมเพื่อลดระยะเวลาและเพิ่มผลผลิต

ผลการเปรียบเทียบจากตารางข้างต้นพบว่ากระบวนการผลิตกรดมาลิกจากวิธีทางชีวภาพมีประโยชน์หลายประการ และสามารถนำมาประยุกต์ใช้ได้จริง ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงสนใจการผลิตกรดมาลิกจากวิธีทางชีวภาพโดยใช้จุลินทรีย์เปลี่ยนน้ำตาลไซโลสเป็นกรดมาลิก

2.6 กระบวนการแยกกรดมาลิกและการทำให้บริสุทธิ์ (Downstream processing)

2.6.1 กระบวนการแยกกรดมาลิก

กระบวนการแยกกรดมาลิกเป็นการแยกกรดมาลิกออกจากผลิตภัณฑ์ทั้งหมดที่อยู่ในน้ำหมัก (Bechthold และคณะ, 2008) ซึ่งกระบวนการแยกประกอบด้วย 1. การแยกเศษวัสดุกลไกโนเชลลูโลส หรือตะกอนต่างๆออกด้วยการกรองหรือการปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วสูง 2. ในขั้นตอนนี้จะได้ส่วนน้ำหมักออกมา และทำการแยกส่วนที่เป็นกรดมาลิกออกมา ซึ่งมีวิธีต่างๆดังนี้ประกอบด้วย 1.การทำให้เกิดผลึก 2.การตกตะกอน 3.การแยกด้วยกระดาษกรอง 4. การสกัดด้วยสารละลายทางเคมี

1. การทำให้เกิดผลึก (Direct crystallization) โดยการนำกรดอินทรีย์ไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เพื่อกำจัดสารอื่นๆที่ไม่ใช่กรดอินทรีย์ จากนั้นนำไปกลั่นโดยการลดความดัน (vacuum distillation) และนำไปแช่ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อจะทำให้เกิดเป็นผลึกของกรดอินทรีย์ (Cheng และคณะ, 2012)

2. การตกตะกอน (Precipitation) โดยการเติมแคลเซียมไฮดรอกไซด์ (Ca(OH)_2), แคลเซียมออกไซด์ (CaO) หรือ แอมโมเนีย (NH_3) ในน้ำหมัก ซึ่งจะเกิดเป็นตะกอนเกลือ และนำตะกอนไปกรองด้วยกระดาษกรอง พบว่ากรดมาลิกและกรดอินทรีย์ต่างๆจะอยู่บนกระดาษกรอง กำจัดเซลล์และโปรตีนโดยการล้างออกด้วยน้ำกลั่น เราสามารถนำตะกอนที่อยู่ด้านบนไปทำให้บริสุทธิ์ได้ แต่วิธีนี้มีข้อเสียคือแคลเซียมไอออนจะเกิดเป็นยับยั้งทำให้ยากต่อการแยกมาลิกออกมาจากยับยั้ง (Cheng และคณะ, 2012)

3.การแยกด้วยกระดาษกรอง (Membrane separation) ซึ่งกระดาษกรองที่ใช้ควรเป็น microfiltration, ultrafiltration และ nano-filtration หรือ electro-dialysis ข้อเสียของวิธีนี้คือค่าผลได้ของกรดอินทรีย์น้อย (Cheng และคณะ, 2012)

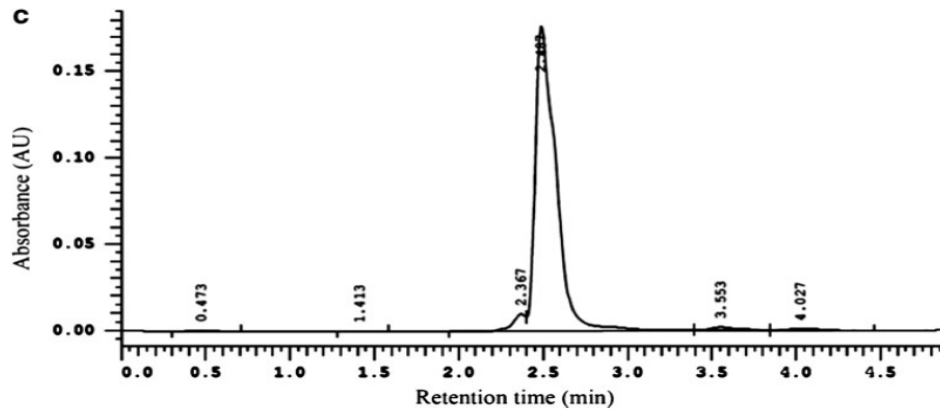
4. การสกัดด้วยสารละลายทางเคมี (Solvent extraction) คือการใช้ liquid/liquid extraction เป็นวิธีที่ดีและใช้กันอย่างกว้างขวาง แต่วิธีนี้มีข้อเสียคือไม่สามารถเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์หลักออกมาได้อย่างสมบูรณ์ได้ (Cheng และคณะ, 2012)

2.6.2 กระบวนการทำให้กรดมาลิกบริสุทธิ์

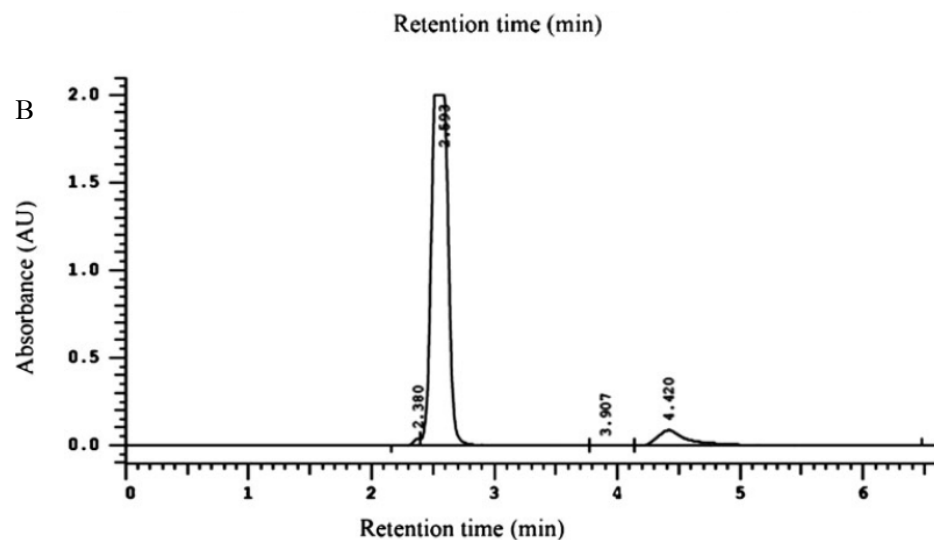
2.6.2.1 กระบวนการทำให้กรดมาลิกบริสุทธิ์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography : HPLC)

HPLC เป็นเครื่องมือที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ได้ 3 วิธี คือ การวิเคราะห์ชนิดของสาร การทำให้บริสุทธิ์ และการทำให้แยกออกจากกันเป็นส่วนๆ ซึ่ง HPLC ใช้สำหรับแยกสารประกอบที่สนใจที่ผสมอยู่ในตัวอย่าง โดยกระบวนการแยกสารประกอบที่สนใจจะเกิดขึ้นระหว่างเฟส 2 เฟส คือ เฟสอยู่กับที่ (stationary phase) หรือ คอลัมน์ (column) กับเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) ซึ่งจะถูกแยกออกมาในเวลาที่แตกต่างกัน สารผสมที่อยู่ในตัวอย่างสามารถถูกแยกออกจากกันได้นั้นจะขึ้นอยู่กับความสามารถในการละลายได้ดีของสารนั้นกับเฟสเคลื่อนที่หรือเฟสอยู่กับที่ โดยสารประกอบตัวไหนที่สามารถละลายได้ดีกับเฟสเคลื่อนที่ สารนั้นก็จะถูกแยกออกมาก่อน ส่วนสารที่ละลายได้ไม่ดีกับเฟสเคลื่อนที่ ก็จะถูกแยกออกมาทีหลังโดยสารที่ถูกแยกออกมาได้นี้จะถูกตรวจวัดสัญญาณด้วยตัวตรวจวัดสัญญาณ (detector) และสัญญาณที่บันทึกได้จากตัวตรวจวัดจะมีลักษณะเป็นพีค ซึ่งจะเรียกว่า โครมาโตแกรม (chromatogram) กระบวนการทำให้กรดมาลิก บริสุทธิ์ปัจจัยสำคัญอยู่ที่ชนิดของคอลัมน์ ซึ่งคอลัมน์ที่เหมาะสมแก่การทำให้กรดมาลิกบริสุทธิ์นั้นคือ ไอออนเอ็กซ์เชนจ์โครมาโตกราฟี ซึ่งอาศัยหลักการแลกเปลี่ยนไอออนในสารละลายกับไอออนในของแข็งที่สัมผัสกับสารละลายนั้น ไอออนเอ็กซ์เชนจ์โครมาโตกราฟีสามารถใช้ได้อย่างกว้างขวางในการวิเคราะห์ไอออนของสารอินทรีย์

Ma และคณะ (2013) ได้ทำการวิเคราะห์หากรดอินทรีย์ชนิดแคลเซียมมาเลทในน้ำหมัก โดยใช้เครื่อง HPLC วิเคราะห์ คอลัมน์ที่ใช้คือ ZORBAXSB-C18 column (5.0 μm , 4.6 mm $\times$ 150 mm) เฟสเคลื่อนที่คือ $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ละลายในเมทานอลร้อยละ 10 ปริมาตร/ปริมาตร ทำการ degassed ด้วยไมโครเวฟ และ flow rate คือ 1.0 มิลลิลิตร/นาที อุณหภูมิคอลัมน์คือ 30 องศาเซลเซียส ตัวตรวจวัดสัญญาณคือ Diode-Array ความยาวคลื่นคือ 210 นาโนเมตร สารละลายมาตรฐานคือแคลเซียมมาเลทจากบริษัทซิกมา (St. Louis, MO, USA) หลังจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC พบว่ากรดอินทรีย์ที่เกิดขึ้นในน้ำหมักเป็นแคลเซียมมาเลท เนื่องจากแคลเซียมมาเลทในน้ำหมักมีค่า Retention time ใกล้เคียงกับสารละลายมาตรฐานแคลเซียมมาเลทที่ซื้อมาจากบริษัทซิกมา (รูปที่ 2.18) คือมีค่า Retention time เท่ากับ 2.593 นาที (รูปที่ 19)



รูปที่ 2.18 กราฟมาตรฐานของสารละลายแคลเซียมมาเลทที่ถูกวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC
(Ma และคณะ, 2013)

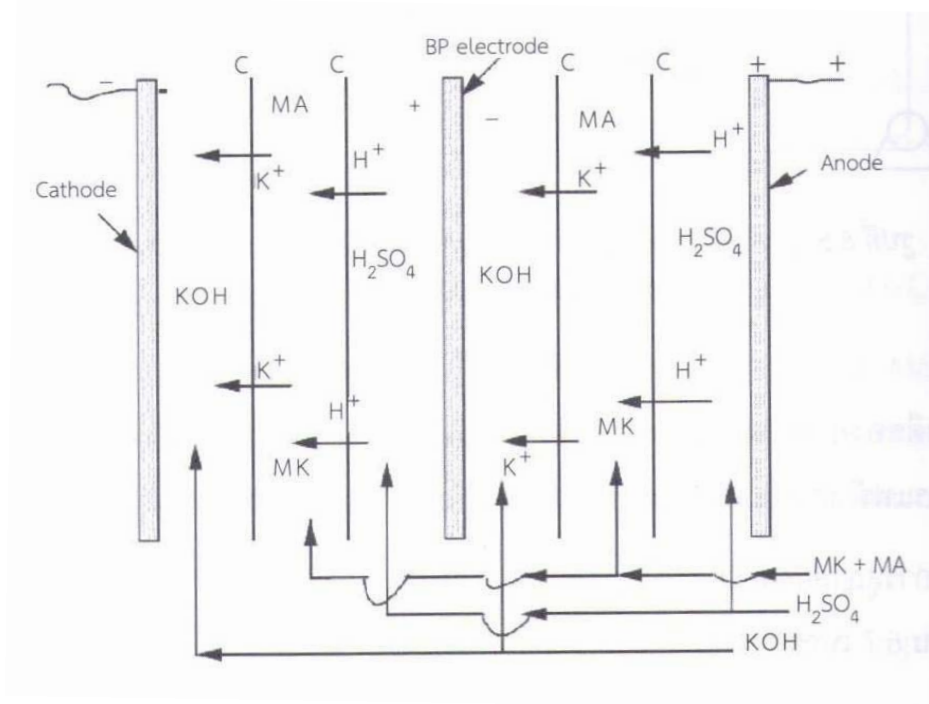


รูปที่ 2.19 สารละลายแคลเซียมมาเลทในน้ำหมักที่ถูกวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC
(Ma และคณะ, 2013)

2.6.2.2 การทำงานร่วมกันของการแยกสลายด้วยไฟฟ้า และเมมเบรนแลกเปลี่ยนประจุบวก (Combination of electrolysis and cation-exchange membrane)

การทำงานร่วมกันของการแยกสลายด้วยไฟฟ้า และเมมเบรนแลกเปลี่ยนประจุบวก โดยบริเวณขั้วบวกจะมีการสร้าง H^+ ระหว่างการสลายตัวของน้ำ ซึ่งจะเข้าไปแทนที่ไอออน K^+ (รูปที่ 2.20) เนื่องจากกรดมาลิกและกรดฟumaric มีค่าคงที่ของการแตกตัวต่ำ ส่วนใหญ่ประจุบวกที่ไปถึงขั้วลบได้

โดยการแลกเปลี่ยนประจุบวกผ่านเมมเบรนคือ K^+ ซึ่งมีประสิทธิภาพทางไฟฟ้าสูง (Korngold และคณะ, 2006) การทำงานร่วมกันของการแยกสลายด้วยไฟฟ้าและเมมเบรนแลกเปลี่ยนประจุบวกเป็นการทดลองการแยกกรดมาลิกออกในระดับห้องปฏิบัติการ (laboratory unit)



รูปที่ 2.20 การแพร่ในสนามไฟฟ้าของโพแทสเซียมมาเลทในอิเล็กโทรด 2 ขั้ว C: Cation exchange membrane, A: Anion exchange, MK: potassium malate, MA: Malic acid, BP: bipolar (Korngold และคณะ, 2006)