

การประยุกต์ใช้สถิติเพื่อการออกแบบสภาวะที่เหมาะสมในการหมักกรดอินทรีย์
จากผลตะลิงปลิงโดย *Zygosaccharomyces rouxii* TISTR 5044 สำหรับทำยางก้อนถ้วย

Application of Statistical Experimental Methods to Optimize Medium for
Organic Acid Fermentation from Bilimbi (*Averrhoa bilimbi* L.) Fruit by
Zygosaccharomyces rouxii TISTR 5044 for Natural Rubber Coagulant

พัชรี หล่งหม่าน* จีรนันท์ กล่อมมนรา แก้วรักษา และ จาตุรนต์ ทิพย์วงศ์

Patcharee Lungmann*, Cheeranun Klomnara Kalraksa, Jarturon Thipwong

สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสุราษฎร์ธานี

Program in Biology, Faculty of Science and Technology, Suratthani Rajabhat University

Received : 23 September 2017

Accepted : 25 November 2017

Published online : 1 December 2017

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดอินทรีย์จากน้ำหมักผลตะลิงปลิง หมักด้วย *Zygosaccharomyces rouxii* TISTR 5044 โดยการออกแบบสูตรด้วยวิธี two-level factorial design และการตอบสนองแบบพื้นผิว โดยมีปัจจัย 4 ปัจจัย ที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุดและสูงสุด จากนั้นนำน้ำหมักมาใช้เป็นสารจับตัวสำหรับทำยางก้อนถ้วย ผลการศึกษาพบว่า สูตรน้ำหมักประกอบด้วย ผลตะลิงปลิง : น้ำ : กากน้ำตาล : *Zygosaccharomyces rouxii* TISTR 5044 ที่มีอัตราส่วน 25 : 13 : 13 : 7 หมักในถังพลาสติกขนาด 25 ลิตร ที่ระยะเวลาหมัก 10 วัน บ่มที่อุณหภูมิห้อง ให้กรดอินทรีย์สูงสุด 23.40 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสูงกว่าสูตรเริ่มต้น 1.4 เท่า ผลการทำนายด้วยวิธีตอบสนองแบบพื้นผิว สูตรน้ำหมักที่ประกอบด้วย ผลตะลิงปลิง : น้ำ : กากน้ำตาล : *Zygosaccharomyces rouxii* TISTR 5044 อัตราส่วน 25 : 13 : 13 : 7 ผลิตกรดอินทรีย์สูงสุด 22.78 เปอร์เซ็นต์ องค์ประกอบของกรดอินทรีย์เมื่อนำมาวิเคราะห์ด้วย High Performance Liquid Chromatography พบว่ามี L-malic acid, succinic acid, lactic acid และ acetic acid ปริมาณ 507.140, 2,827.442, 2064.356 และ 1325.335 พีพีเอ็ม ส่วนการจับตัวของน้ำยางพบว่าน้ำหมักผลตะลิงปลิงและกรดชีวภาพทางการค้า ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ทำให้น้ำยางปริมาตร 300 มิลลิลิตร จับตัวเป็นก้อนใช้เวลา 4 นาที ส่วนกรดฟอรั่มิก ใช้เวลานานสุด 24 นาที ลักษณะทางกายภาพของยางก้อนถ้วยที่เติมน้ำหมักชีวภาพผลตะลิงปลิงจะมีสีคล้ำกว่าการใช้กรดชีวภาพทางการค้าและกรดฟอรั่มิก

คำสำคัญ : การออกแบบการทดลอง ตะลิงปลิง กรดอินทรีย์ ยางก้อนถ้วย ไชโกแซ็กคาโรไมซีส รูซิไอ

*Corresponding author. E-mail : plungmann@yahoo.com

ABSTRACT

The study investigated on medium optimization for production of organic acid from Bilimbi (*Averrhoa bilimbi* L.) fruit by *Zygosaccharomyces rouxii* TISTR 5044 through fermentation, using the two-level factorial design and response surface method. The two-level factorial experiment was designed by setting four parameters at the lowest and highest of concentrations. The organic acid produced by fermentation of Bilimbi fruit was used as natural rubber coagulant. The results of the two-level factorial design revealed that the organic acid production with the ratio of Bilimbi fruit : water : molasse : *Zygosaccharomyces rouxii* TISTR 5044 fermented in 25L plastic bucket for 10 days at room temperature yielded 23.40 percent of organic acid, which was 1.4 times higher than that obtained in the original medium. The yield of organic acid in medium containing Bilimbi fruit : water:molasse : *Zygosaccharomyces rouxii* TISTR 5044 at the ratio of 25:13:13: 7 which predicted by response surface methodology was 22.78 percent. The organic acids from this fermentation analyzed by High Performance Liquid Chromatography consisted of L-malic acid, succinic acid, lactic acid and acetic acid at 507.140, 2,827.442, 2,064.356 and 1,325.335 ppm respectively. The suitable amount of organic acid from Bilimbi fruit and commercial organic acid for 300 ml of natural rubber latex are 30 ml. The cure time of natural rubber coagulant was 4 min. whereas the formic acid was 24 min. The color of natural rubber cured by organic acid from Bilimbi fruit was darker than that of commercially available organic acid and formic acid.

Keywords : experimental design, Bilimbi (*Averrhoa bilimbi* L.) , organic acid, natural rubber coagulant, *Zygosaccharomyces rouxii* TISTR 5044

บทนำ

เกษตรกรชาวสวนยางส่วนใหญ่มักมีการใช้กรดที่ได้จากการสังเคราะห์ เช่น กรดฟอร์มิก (formic acid) กรดอะซิติก (acetic acid) หรือกรดซัลฟูริก (sulfuric acid) เพื่อเป็นสารจับตัวในน้ำยาง ทำให้น้ำยางเป็นก้อนเร็วขึ้น (Baimark & Niamsa, 2009 ; John *et al.*, 2011) อย่างไรก็ตามการใช้กรดมีข้อเสียก่อให้เกิดมลพิษในน้ำ ดินและอากาศ (Tekasakul & Tekasakul, 2006) และยังมีผลกระทบต่อมนุษย์ เป็นอันตรายต่อระบบทางเดินหายใจ เกิดอาการแพ้ มีผื่นแดง (Fernando Dinesh & Kaluarachchi, 2012) การใช้กรดอินทรีย์ธรรมชาติเพื่อแปรรูปน้ำยางสดเป็นยางก้อนถ้วยหรือยางแผ่น จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่มีความปลอดภัยและไม่ก่อให้เกิดปัญหามลพิษต่อสิ่งแวดล้อม การหมักกรดอินทรีย์ทำได้โดยนำเศษพืช ผัก ผลไม้ มาหมักกับน้ำตาลตามระยะเวลาที่เหมาะสม โดยมีจุลินทรีย์ใช้สารอาหารผลิตกรดอ่อน สามารถนำไปใช้เป็นสารจับตัวในน้ำยางสด แทนการใช้กรดที่เป็นสารเคมีได้ การใช้สารชีวภาพจากวัสดุเหลือใช้ช่วยลดต้นทุนการผลิตจึงเป็นทางเลือกใหม่ จากการรายงานของ Phetphaisit *et al.* (2012) ได้นำมะนาว มะกรูด สับปะรดและส้ม มาทำน้ำหมักเพื่อทำยางแผ่น พบว่าคุณสมบัติทางกายภาพ และเชิงกลไม่มีความแตกต่างกันเมื่อเปรียบเทียบกับกรดฟอร์มิก

กระบวนการและขั้นตอนการผลิตกรดอินทรีย์ วัตถุประสงค์ที่ส่วนใหญ่ยังขาดคุณภาพ ทำให้ผลิตภัณฑ์กรดอินทรีย์ที่ได้มีคุณภาพไม่แน่นอนเนื่องจากต้องอาศัยจุลินทรีย์จากธรรมชาติ ซึ่งส่วนใหญ่มีการปนเปื้อนของยีสต์และจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ เนื่องจากไม่ผ่านกระบวนการกำจัดเชื้อปนเปื้อน กระบวนการหมักด้วยเทคนิคปลอดเชื้อและการใช้หัวเชื้อบริสุทธิ์

เพื่อเปลี่ยนสารอินทรีย์ในวัตถุดิบเกิดเป็นสารต่างๆ เช่น กลิ่น เอทิลแอลกอฮอล์ กรดอินทรีย์ และคาร์บอนไดออกไซด์ จะทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพ เนื่องจากกล้าเชื้อบริสุทธิ์มีความแข็งแรง ขยายพันธุ์ต่อได้รวดเร็ว และอยู่ในระยะที่กำลังเจริญอย่างรวดเร็ว (log phase) สามารถให้ผลผลิตที่ต้องการได้ในปริมาณมาก (Holzapfel, 2002) มีรายงานการวิจัยการใช้แบคทีเรียผลิตกรดอินทรีย์ชนิดกรดซัคซินิก (succinic acid) โดย *Actinobacillus succinogenes*, *Anaerobiospirillum succiniciproducens* และ *Mannheimia succiniciproducens* (Song&Lee, 2006) กรดแลคติก (lactic) ผลิตโดย *Lactobacillus* sp. (Patel&Parikh, 2016) เชื้อรา *Aspergillus terreus* และ *A. oryzae* ผลิตกรดอิทาโคนิก (itaconic acid) และ กรดฟูมาริก (fumaric acid) (Jiménez-Quero *et al.*, 2017) สำหรับยีสต์ที่ผลิตกรดอินทรีย์มีงานวิจัยค่อนข้างน้อยส่วนใหญ่มักนำมาผลิตเอทานอล แต่การใช้เชื้อยีสต์ในกระบวนการหมักใช้ได้ดีในอุตสาหกรรม เนื่องจากยีสต์มีความทนต่อความเข้มข้นของน้ำตาลและไม่ไหวต่อโลหะหนัก โดยเฉพาะ *Z. rouxii* สามารถหมักวัตถุดิบที่เป็นผลไม้และเจริญเติบโตได้ดีในสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม (Janine *et al.*, 2003 ; Pribylova *et al.*, 2007)

การออกแบบการทดลอง (experimental design) โดยใช้เทคนิคทางสถิติขั้นสูงเพื่อปรับค่าสภาวะของกระบวนการให้ได้ผลตอบสนองเป็นไปตามที่เราต้องการ ซึ่งแตกต่างจากการทดลองแบบเดิมที่มักลองผิดลองถูก หรือใช้การทดลองปรับตั้งค่ากระบวนการทีละค่า (one-factor-at-a-time) เป็นวิธีที่ง่ายแต่ไม่สามารถหาความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรได้ ในทางกลับกันการออกแบบการทดลอง เช่น แฟกทอเรียล (factorial design) หรือการออกแบบส่วนผสม (mixture design) เป็นการศึกษาปัจจัยการทดลองหลายปัจจัยและศึกษาถึงผลรวมที่เกิดขึ้นจากปัจจัยเหล่านั้น ซึ่งมีข้อดีคือเป็นการใช้หน่วยทดลองทั้งหมดเพื่อตรวจสอบอิทธิพลของทรีทเมนต์ (treatment) หลายทรีทเมนต์พร้อมกัน และสามารถตรวจสอบอิทธิพลร่วมระหว่างปัจจัยได้ จึงเป็นการประหยัดและใช้เวลาน้อยลงกว่าการทดลองครั้งละ 1 ปัจจัย แต่อาจมีข้อจำกัดคือหน่วยทดลองมากขึ้นทำให้เสียค่าใช้จ่ายสูง การใช้สถิติเพื่อการออกแบบการวิจัย เป็นที่นิยมจากนักวิจัยหลายท่าน เช่น การผลิตพอลิเมอร์ชีวภาพจาก *Halobacterium* sp. SM5 (Lungmann *et al.*, 2007) การผลิตลิแวนจาก *Zymomonas mobilis* (Melo *et al.*, 2007) การผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตจาก *Comamonas* sp. EB172 (Johar *et al.*, 2012) และการผลิตกรดแลคติกจาก *Lactobacillus bulgaricus* (Omay&Guvenilir, 2012) เป็นต้น คณะผู้วิจัยจึงศึกษาวิธีพื้นผิวตอบสนอง (response surface methodology, RSM) ซึ่งเป็นวิธีการทางคณิตศาสตร์และสถิติที่สร้างแบบจำลองและวิเคราะห์ปัญหาซึ่งแสดงผลตอบสนองต่อผลจากตัวแปรต่างๆ เพื่อหาความเหมาะสมต่อผลนั้น โดยศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการหมักกรดอินทรีย์และแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่เหมาะสมเพื่อทำนายการผลิตกรดอินทรีย์จากผลตะลึงปลิง ซึ่งตะลึงปลิงเป็นพืชที่ให้ผลตลอดปี พบได้แถบทุกครัวเรือนตามชนบท แต่มีการใช้ประโยชน์ค่อนข้างน้อยเว้นแต่นำมาประกอบอาหาร

วิธีการดำเนินวิจัย

1. การศึกษาสูตรปัจจัยที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดอินทรีย์

1.1 การเตรียมวัตถุดิบสำหรับทำน้ำหมักชีวภาพ

1.1.1 ผลตะลึงปลิง

นำผลตะลึงปลิงมาทำความสะอาด หั่นให้มีขนาดเล็ก บดให้ละเอียดและกรองด้วยผ้าขาวบาง เอาเฉพาะน้ำมาฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนมากับผลตะลึงปลิง โดยต้มให้เดือดที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที

1.1.2 กล้าเชื้อจุลินทรีย์

นำเชื้อบริสุทธิ์ *Z. rouxii* TISTR 5044 เลี้ยงในอาหาร Yeast Malt Broth บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวัดความขุ่นด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ให้ได้ความขุ่นเท่ากับ 0.5 ใช้เป็นหัวเชื้อในการหมักกรดอินทรีย์

1.2. การออกแบบสูตรน้ำหมักตะลิงปลิง

ส่วนผสมของวัตถุดิบสำหรับทำน้ำหมักกรดอินทรีย์ ดัดแปลงจากสูตรของกรมพัฒนาที่ดิน อำเภอบ้านสิงห์ จังหวัดสุราษฎร์ธานี โดยใช้วัตถุดิบ : น้ำ : กากน้ำตาล อัตราส่วน 30:10:10 ปริมาณหัวเชื้อ 10% นำมาออกแบบสูตรน้ำหมักกรดอินทรีย์ด้วยวิธี two-level factorial design ที่ระดับความเข้มข้นของปัจจัย 2 ระดับ จากระดับความเข้มข้นเดิมคือ ระดับความเข้มข้นต่ำสุด (lower level) กำหนดสัญลักษณ์ -1 และระดับความเข้มข้นสูงสุด (upper level) กำหนดสัญลักษณ์ +1 (แสดงในตารางที่ 1) จากนั้นนำข้อมูลจากตารางที่ 1 เข้าโปรแกรม Design Expert 8.0.7.1 software (Informer Technologies, Inc., 2017) ได้สูตรน้ำหมักกรดอินทรีย์ทั้งหมด 16 สูตร

ตารางที่ 1 การออกแบบสูตรน้ำหมักกรดอินทรีย์จากผลตะลิงปลิง โดยวิธี two-level factorial design ที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุดและสูงสุด

ตัวแปร (variables)	สัญลักษณ์ของปัจจัย (codes level, factors)			ปัจจัยในรูปของ ξ_i (factors in terms of ξ_i)
	ξ_i	-1	+1	
A = ผลตะลิงปลิง	ξ_1	25	35	$A = (\xi_1 - 30)/5$
B = น้ำ	ξ_2	7	13	$B = (\xi_2 - 10)/3$
C = กากน้ำตาล	ξ_3	7	13	$C = (\xi_3 - 10)/3$
D = <i>Zygosaccharomyces</i> <i>rouxii</i> TISTR 5044	ξ_4	7	13	$D = (\xi_4 - 10)/3$

หมายเหตุ : ξ_i คือ ความเข้มข้นของปัจจัยที่ระดับต่ำสุดและระดับสูงสุด ใช้สัญลักษณ์ -1 และ +1

1.3. กระบวนการหมัก

เตรียมภาชนะสำหรับหมักวัตถุดิบโดยผ่านการฆ่าเชื้อด้วยความร้อน จากนั้นนำวัตถุดิบปริมาณต่างๆ ของแต่ละสูตรทั้ง 16 สูตร และชุดควบคุม (น้ำคั้นตะลิงปลิง) บรรจุลงในถังพลาสติกขนาด 25 ลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 40 วัน เก็บตัวอย่างน้ำหมักทุก 10 วัน ของการบ่ม มาวิเคราะห์ปริมาณกรดทั้งหมดโดยวิธีการไตเตรทพีเอช เชื้อจุลินทรีย์ เช่น รา แบคทีเรียทั้งหมด แบคทีเรียแลคติก ตามวิธี AOAC. (2000)

2. ชนิดกรดอินทรีย์

การวิเคราะห์ปริมาณกรดอินทรีย์ (กรดมาลิก กรดซัคซินิก กรดแลคติกและกรดอะซิติก) ในน้ำหมักอินทรีย์จากผลตะลิงปลิง โดยส่งตัวอย่างวิเคราะห์ ณ หน่วยวิจัยพฤกษเคมี มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน วิเคราะห์ด้วยเครื่อง high performance liquid chromatography (HPLC) ชนิด 2998 photodiode array detector (PDA) โครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออน (ion-exchange chromatography) ขนาด 210 นาโนเมตร คอลัมน์ชนิด Rezex Organic acid (H⁺) (8%) (phenomenex) ขนาด 300 x 7.8 มิลลิเมตร โดยใช้เฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) 0.006 N

H₂SO₄ ในสภาวะการทดสอบที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ความดัน 474 psi อัตราการไหล (flow rate) 0.6 มิลลิลิตร/นาที่

3. การศึกษาน้ำหมักผลตะลึงปลิงต่อการจับตัวของน้ำยางเพื่อใช้ทำยางก้อนถ้วย

เก็บรวบรวมน้ำยางจากต้นยางพันธุ์ 600 อายุ 14 ปี กรองให้สะอาด นำถ้วยรองน้ำยางที่สะอาดวางเรียงบนพื้นที่เรียบสม่ำเสมอ เทน้ำยางที่ผ่านการกรองลงในถ้วยรองน้ำยาง ถ้วยละ 300 มิลลิลิตร เติมน้ำหมักอินทรีย์ในสูตรที่ผลิตกรดอินทรีย์สูงสุด ปริมาตร 5, 10, 15, 20, 25, 30 และ 35 มิลลิลิตร ต่อ 1 ถ้วย เปรียบเทียบกับการใช้กรดชีวภาพทางการค้าและกรดฟอร์มิกในปริมาณเท่ากับน้ำหมักอินทรีย์ กวนให้เข้ากันดี จากนั้นจับเวลาการแข็งตัวของน้ำยางและลักษณะทางกายภาพของยางก้อนถ้วย

4. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การวิเคราะห์ผลการทดลองใช้โปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ Design expert 8 software โดย 1) ศึกษาวิธีพื้นผิวตอบสนอง (RSM) เพื่อทำนายสูตรที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดอินทรีย์ 2) การวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจ (R-Square: R-Sq) เพื่อวิเคราะห์ว่าการออกแบบที่ใช้ในการทดลองมีความเหมาะสมหรือไม่ 3) การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) เป็นการตรวจสอบแหล่งผันแปรของแบบจำลองโดยพิจารณาจากค่า P-value ของเทอมต่างๆ ที่วิเคราะห์ความแปรปรวนได้เปรียบเทียบกับค่านัยสำคัญทางสถิติที่กำหนด 4) การสร้างสมการทำนายปริมาณกรดอินทรีย์ที่ได้จากการหมักผลตะลึงปลิงโดยนำค่าของปัจจัยที่ได้จากการวิเคราะห์สัมประสิทธิ์ของสมการถดถอยของปริมาณกรดอินทรีย์ที่หมักได้จากผลตะลึงปลิงมาเขียนในรูปสมการที่ 1

$$Y_i = \beta_0 + \beta X_i + \varepsilon_i \quad (1)$$

เมื่อ Y_i แทนตัวแปรตาม (dependent variable); X_i แทนตัวแปรอิสระ (independent variable);

β_0 แทนระยะตัดแกน y (y – intercept); β แทนความชันของเส้นถดถอย (slope)

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

1. ปริมาณกรดอินทรีย์ที่ได้จากการหมักผลตะลึงปลิง

การผลิตกรดอินทรีย์จากผลตะลึงปลิงโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูปในการออกแบบสูตรปัจจัยด้วยวิธี two-level factorial design ซึ่งมี 4 ปัจจัย ผลที่ได้แสดงในตารางที่ 2 จากตารางที่ 2 น้ำหมักกรดอินทรีย์จากผลตะลึงปลิงในวันที่ 0 ของการหมัก พบแบคทีเรียแลคติกและเชื้อรามากกว่า 300 CFU/ml ยกเว้น สูตรที่ 13 และ 14 พบเชื้อราน้อยกว่า 30 CFU/ml เพื่อชอยู่ระหว่าง 2.33–3.95 ปริมาณกรดอินทรีย์อยู่ในช่วง 5.85–7.42 เปอร์เซ็นต์ และที่เวลาการหมัก 40 วัน ในสูตรที่ 8 10 12 และ 16 พบแบคทีเรียทั้งหมด แบคทีเรียแลคติก และเชื้อรา น้อยกว่า 30 CFU/ml กรดอินทรีย์อยู่ในช่วง 4.5–20.7 เปอร์เซ็นต์ ส่วนสูตรปัจจัยที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดอินทรีย์ คือสูตรที่ 7 ประกอบด้วยอัตราส่วนของผลตะลึงปลิง : น้ำ : กากน้ำตาล : หัวเชื้อ เท่ากับ 25 : 13 : 13 : 7 หมักเป็นเวลา 10 วัน ให้กรดอินทรีย์สูงสุด 23.4 เปอร์เซ็นต์ เมื่อพิจารณาปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตกรดอินทรีย์ ที่เวลาการหมัก 10 วัน พบว่าตัวแปรผลตะลึงปลิงที่อัตราส่วนระดับต่ำสุด (low level) เท่ากับ 25 เปอร์เซ็นต์ เป็นสูตรปัจจัยที่มีกรดอินทรีย์มากกว่า 15 เปอร์เซ็นต์ พบได้ในสูตรที่ 1 3 5 7 9 13 และ 15 โดยกรดอินทรีย์มีค่าเท่ากับ 17.55, 17.1, 19.35, 23.4, 16.65, 15.075 และ 17.1 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

กรดอินทรีย์พบได้ในผักและผลไม้ มีความสำคัญในวัฏจักรการสร้างพลังงานของสิ่งมีชีวิต จากงานวิจัยของ Liawruangrath et al. (2015) กรดอินทรีย์ที่หมักโดยใช้ผล อะโวคาโด (avocado) หมักโดย *Lactobacillus casei* spp. ใน 7 วันแรกของการหมักให้กรดมาลิก กรดซิตริก และกรดทาร์ทาริก 0.65, 0.21 และ 0.10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อหมักไว้ 5 สัปดาห์มีปริมาณ 0.43, 1.28 และ 0.05 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรียและเชื้อรา มีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายวัสดุอินทรีย์ และเกิดปฏิกิริยาทางชีวเคมี ในการผลิตกรดอินทรีย์ เช่น กลุ่มแบคทีเรียผลิตกรดแลคติก สามารถสร้างกรดแลคติก กรดฟอร์มิก เอทานอล และคาร์บอนไดออกไซด์ ในสภาพที่ไม่มีออกซิเจนและสภาพที่มีออกซิเจนเกิดการออกซิไดซ์สารประกอบอินทรีย์ทำให้ผลิตกรดอินทรีย์ (Sundberg&Jonsson, 2005) ส่วนเชื้อรา *Aspergillus niger* ผลิตกรดอินทรีย์ชนิดกรดซิตริก โดยใช้ซูโครสเป็นสับสเตรทในกระบวนการหมัก (Kishore&Reddy, 2012)

ตารางที่ 2 ปริมาณกรดอินทรีย์ พีเอช และเชื้อจุลินทรีย์ ที่ได้จากการหมักผลตะลิงปลิงของแต่ละหน่วยการทดลอง

สูตร ปัจจัย	ตัวแปร				ระยะเวลาการหมักน้ำหมักชีวภาพ 0 วัน					ระยะเวลาการหมักน้ำหมักชีวภาพ 10 วัน				
	A	B	C	D	กรด อินทรีย์ (%)	pH	แบคทีเรีย ทั้งหมด (CFU/ml)	แบคทีเรีย แลคติก (CFU/ml)	เชื้อรา (CFU/ml)	กรด อินทรีย์ (%)	pH	แบคทีเรีย ทั้งหมด (CFU/ml)	แบคทีเรีย แลคติก (CFU/ml)	เชื้อรา (CFU/ ml)
1	25	7	7	7	5.85	3.53	>300	>300	>300	17.55	3.70	N	N	N
2	35	7	7	7	5.85	3.43	202	>300	>300	14.85	3.58	N	N	N
3	25	13	7	7	6.75	3.77	>300	>300	>300	17.1	3.65	N	N	N
4	35	13	7	7	6.3	3.61	138	>300	>300	14.85	3.56	N	N	N
5	25	7	13	7	6.75	3.95	>300	>300	>300	19.35	3.88	N	N	N
6	35	7	13	7	7.2	3.87	>300	>300	>300	17.55	3.80	N	N	N
7	25	13	13	7	6.97	4.08	>300	>300	>300	23.4	4.04	N	N	N
8	35	13	13	7	6.75	3.79	>300	>300	>300	18.9	3.84	N	N	N
9	25	7	7	13	5.85	3.22	20	>300	>300	16.65	3.65	N	N	N
10	35	7	7	13	5.85	3.84	>300	>300	>300	13.05	3.62	N	N	N
11	25	13	7	13	6.3	2.81	10	>300	>300	14.85	3.61	N	N	N
12	35	13	7	13	7.2	2.33	>300	>300	>300	11.025	3.59	N	N	N
13	25	7	13	13	7.2	3.11	>300	>300	44	15.075	3.65	N	N	N
14	35	7	13	13	7.2	2.94	>300	>300	31	13.725	3.71	N	N	N
15	25	13	13	13	6.75	2.81	>300	>300	>300	17.1	3.75	N	N	N
16	35	13	13	13	7.42	2.45	>300	>300	>300	13.275	3.62	N	N	N
เริ่มต้น	30	10	10	10	5.85	3.83	>300	>300	>300	16.65	3.72	N	N	N
ชุด ควบคุม					6.075	2.16	N	N	N	4.5	2.07	N	N	N

หมายเหตุ : A คือ ผลตะลิงปลิง ; B คือ น้ำ ; C คือ กากน้ำตาล ; D คือ ปริมาณหัวเชื้อ ; N คือ ไม่ได้วิเคราะห์ ;

ชุดควบคุม คือน้ำคั้นตะลิงปลิง

ตารางที่ 2 ปริมาณกรดอินทรีย์ พีเอช และเชื้อจุลินทรีย์ ที่ได้จากการหมักผลตะลิงปลิงของแต่ละหน่วยการทดลอง (ต่อ)

สูตร ปัจจัย	ตัวแปร				ระยะเวลาการหมักน้ำหมักชีวภาพ 20 วัน					ระยะเวลาการหมักน้ำหมักชีวภาพ 40 วัน				
	A	B	C	D	กรด อินทรีย์ (%)	pH	แบคทีเรีย ทั้งหมด (CFU/ml)	แบคทีเรีย แลคติก (CFU/ml)	เชื้อรา (CFU/ml)	กรด อินทรีย์ (%)	pH	แบคทีเรีย ทั้งหมด (CFU/ml)	แบคทีเรีย แลคติก (CFU/ml)	เชื้อรา (CFU/ ml)
1	25	7	7	7	16.65	3.98	2	1	1	6.75	4.26	>300	>300	>300
2	35	7	7	7	11.25	3.98	>300	>300	>300	4.5	4.80	>300	>300	>300
3	25	13	7	7	12.6	4.01	240	230	208	5.4	4.41	>300	>300	>300
4	35	13	7	7	11.475	3.84	61	106	150	6.75	4.22	<30	>300	>300
5	25	7	13	7	17.325	4.06	8	10	3	20.25	3.98	<30	<30	>300
6	35	7	13	7	19.35	4.06	51	42	94	18.675	4.03	>300	>300	288
7	25	13	13	7	18.45	4.15	1	1	1	20.025	3.99	80	66	42
8	35	13	13	7	17.55	4.01	20	3	10	21.6	4.00	<30	<30	<30
9	25	7	7	13	12.15	3.92	>300	>300	>300	8.1	4.76	>300	>300	>300
10	35	7	7	13	13.275	3.78	>300	>300	>300	8.1	3.82	<30	<30	<30
11	25	13	7	13	14.175	3.87	>300	>300	>300	7.2	4.10	>300	>300	>300
12	35	13	7	13	13.05	3.59	>300	>300	>300	9.45	3.62	<30	<30	<30
13	25	7	13	13	17.1	3.89	>300	>300	>300	14.625	3.00	>300	>300	>300
14	35	7	13	13	17.1	3.75	50	64	49	17.55	3.75	>300	>300	>300
15	25	13	13	13	18	3.86	111	166	132	16.875	3.96	>300	>300	>300
16	35	13	13	13	15.3	3.68	>300	>300	>300	20.7	3.68	<30	<30	<30
เริ่มต้น	30	10	10	10	14.85	3.96	>300	>300	>300	6.75	4.58	>300	>300	>300
ชุด					2.25	3.06	>300	>300	>300	4.5	4.36	>300	>300	>300
ควบคุม														

หมายเหตุ : A คือ ผลตะลิงปลิง ; B คือ น้ำ ; C คือ กากน้ำตาล ; D คือ ปริมาณหัวเชื้อ ; N คือไม่ได้วิเคราะห์ ; ชุดควบคุม คือน้ำคั้นตะลิงปลิง

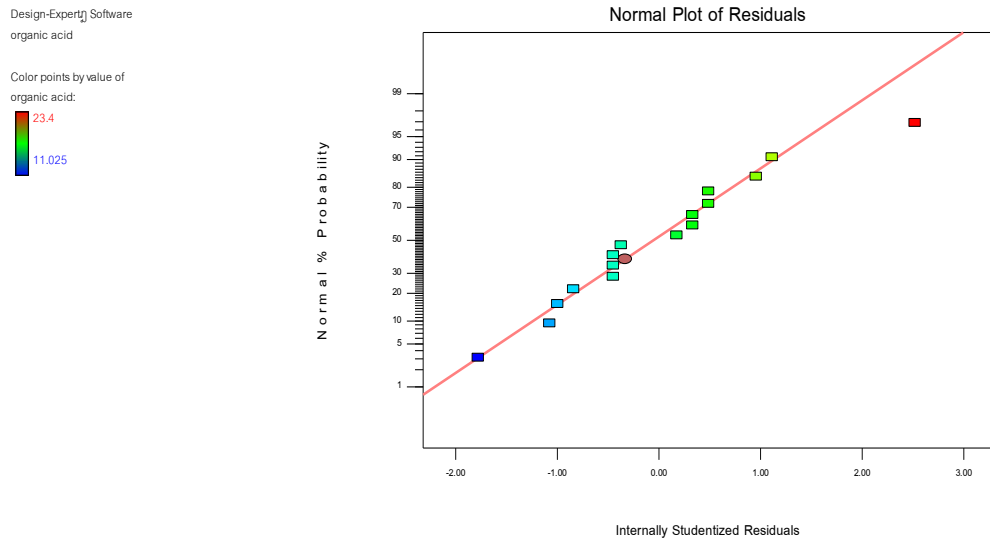
2. ผลการวิเคราะห์ทางสถิติ

2.1 การตรวจสอบความถูกต้องของแบบจำลอง

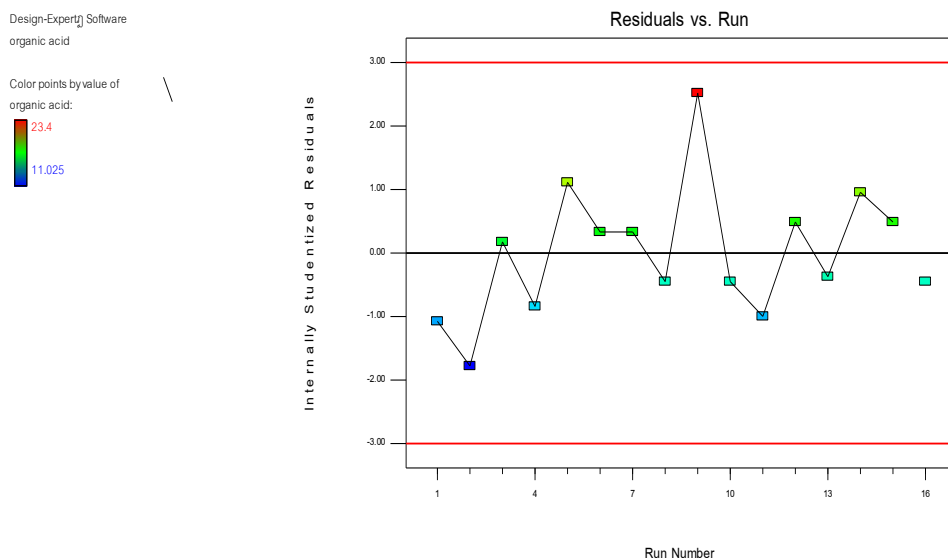
เมื่อทำการหมักกรดอินทรีย์ทั้ง 16 หน่วยทดลอง (ไม่รวมสูตรเริ่มต้น) แล้วนำผลการทดลองที่ได้มาตรวจสอบคุณภาพของข้อมูลว่าเหมาะสมหรือไม่ด้วยการวิเคราะห์ความถูกต้องของแบบจำลอง หากข้อมูลมีความเหมาะสมจึงนำมาวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจ (R-Square: R-Sq) และ วิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) การตรวจสอบคุณภาพข้อมูลซึ่งมี 3 ขั้นตอนคือ 1) การตรวจสอบการกระจายแบบแจกแจงปกติ ซึ่งเป็นการตรวจสอบส่วนตกค้างของข้อมูลว่ามีการกระจายของค่าส่วนตกค้าง (ภาพที่ 1) พบว่ามีการกระจายตัวตามแนวเส้นตรง แสดงให้เห็นว่าส่วนตกค้างจากการทดลองของปริมาณกรดอินทรีย์ที่ได้จากการหมักผลตะลิงปลิงไม่แสดงสิ่งผิดปกติให้เห็น จึงสรุปได้ว่าค่าส่วนตกค้างมีการแจกแจงปกติ 2) การตรวจสอบความเป็นอิสระของข้อมูล (ภาพที่ 2) พบว่าส่วนตกค้างของผลการ

ทดลองปริมาณกรดอินทรีย์จากผลตะลิงปลิงไม่มีรูปแบบที่แน่นอนหรือไม่สามารถประมาณรูปแบบที่แน่นอนได้ มีการกระจายอย่างสม่ำเสมอแสดงว่าข้อมูลมีความเป็นอิสระ 3) การตรวจสอบความเสถียรของความแปรปรวน โดยใช้แผนภูมิกระจายของส่วนตกค้างในแต่ละระดับของปัจจัย (ภาพที่ 3) พบว่าส่วนตกค้างของผลการทดลองของปริมาณกรดอินทรีย์มีการกระจายอย่างสม่ำเสมอทั้งทางบวกและทางลบ แสดงว่าข้อมูลมีความเสถียรของความแปรปรวน

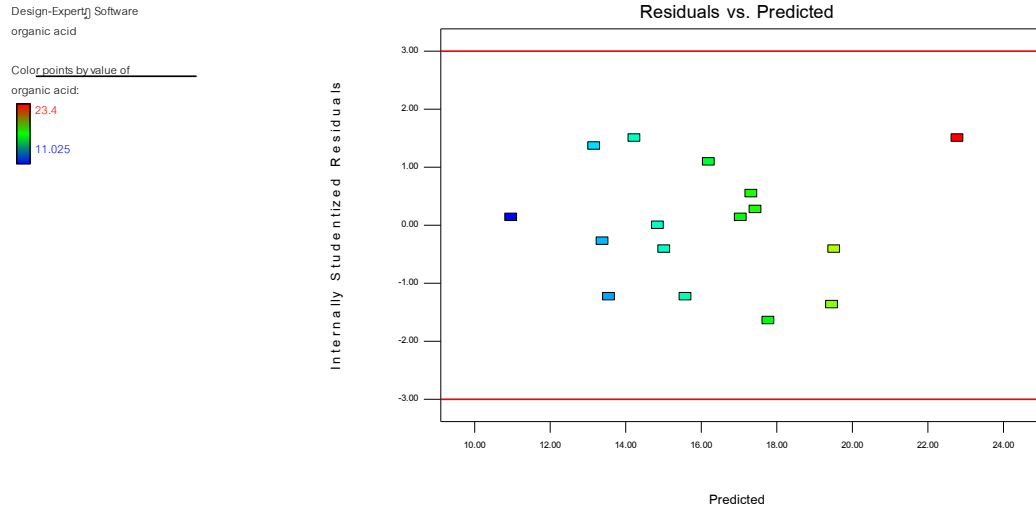
จากการตรวจสอบความถูกต้องของรูปแบบการทดลองทั้ง 3 ขั้นตอนแสดงให้เห็นว่าข้อมูลที่ได้จากการทดลองชุดนี้มีความถูกต้องและเหมาะสมสำหรับนำไปวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจและวิเคราะห์ความแปรปรวน



ภาพที่ 1 กราฟความน่าจะเป็นแบบปกติของส่วนตกค้าง



ภาพที่ 2 แผนภูมิการกระจายของส่วนตกค้างกับลำดับของข้อมูล



ภาพที่ 3 แผนภูมิการกระจายส่วนตกค้างในแต่ละระดับของปัจจัย

2.2 ค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจ (coefficient of determination)

ค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจ (R-Square: R-Sq) เป็นค่าที่ใช้บอกร้อยละการเปลี่ยนแปลงของตัวแปรตามที่สามารถอธิบายได้ด้วยตัวแปรอิสระในสมการถดถอย ผลการวิเคราะห์ที่แสดงในตารางที่ 3 ค่า R-Square เท่ากับ 98 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าแบบจำลองสามารถนำไปสร้างสมการทำนายเพื่อหาค่าผลตอบสนองได้อย่างถูกต้องและเหมาะสม

ตารางที่ 3 การวิเคราะห์การถดถอยของพื้นผิวตอบสนอง

Source	df	Sum of square	Mean of square	F-values	Prob>F
Model	10	129.88	12.99	23.98	0.0013
A=ผลตะลิ่งปลิง	1	35.55	35.55	65.63	0.0005
B=น้ำ	1	0.46	0.46	0.84	0.4011
C=กากน้ำตาล	1	21.28	21.28	39.28	0.0015
D= <i>Z. rouxii</i> TISTR 5044	1	51.84	51.84	95.70	0.0002
AB	1	1.53	1.53	2.83	0.1535
AC	1	0.051	0.051	0.093	0.7721
AD	1	0.11	0.11	0.21	0.6658
BC	1	7.91	7.91	14.60	0.0124
BD	1	3.24	3.24	5.98	0.0582
CD	1	7.91	7.91	14.60	0.0124
Residual	5	2.77	5		
Corrected Total	15	132.59	15		

หมายเหตุ : df=degree of freedom ; R Squared=0.98 (Adjusted R Squared=0.94)

จากตารางที่ 3 ตัวแบบอันดับที่ 1 (first-order models) สำหรับแผนการทดลองแบบ two-level factorial design พบว่าตัวแบบเชิงเส้น (linear model) ใช้ในการศึกษาปัจจัยและการตอบสนองแบบพื้นผิวที่ดีที่สุด เพื่อเป็นการยืนยันการวิเคราะห์ความแปรปรวนโดยใช้ linear model จะมีการพิจารณาสัมประสิทธิ์การตัดสินใจเท่ากับ 0.98 หรือ 98% สมการมีค่า R^2 ยิ่งสูงเท่าใดความแม่นยำของการนำสมการไปใช้เพื่อทำนายหรือคาดคะเน ผลลัพธ์ย่อมมีสูงมากยิ่งขึ้น โดยทั่วไปสมการที่มักนำไปใช้ ควรมีค่า R^2 อย่างน้อย 0.75 (Haaland, 1989 ; Hu, 1999) หากสูงกว่า 0.9 ถือว่าดีมาก ในการวิจัยนี้ค่า R^2 อธิบายได้ว่าผลผลิต (Yield; Y) ที่ได้เป็นผลหรืออิทธิพลจากตัวแปร (ผลตะลึงปลิง กากน้ำตาลและหัวเชื้อ) 98% ส่วนที่เหลืออีก 2% เป็นผลจากตัวแปรหรือปัจจัยอื่นที่ไม่ทราบได้หัวเชื้อถือว่าเป็นปัจจัยที่สำคัญที่สุดในการผลิตกรดอินทรีย์ โดย *Z. rouxii* TISTR 5044 รองลงมาได้แก่ ผลตะลึงปลิง กากน้ำตาล และ น้ำ ตามลำดับ เช่นเดียวกับความสัมพันธ์ระหว่าง 2 ปัจจัย (two-variables interaction) ระหว่างน้ำกับกากน้ำตาล น้ำกับหัวเชื้อ และ กากน้ำตาลกับหัวเชื้อ พบว่ามีความสำคัญอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95%($P<0.05$) ส่วนความสัมพันธ์ระหว่าง 2 ปัจจัยอื่นๆไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95%

2.3 การวิเคราะห์ความแปรปรวน

การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) เป็นการตรวจสอบแหล่งผันแปรของแบบจำลอง จากการวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณกรดอินทรีย์จากการหมักผลตะลึงปลิงที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ 0.05 ในตารางที่ 3 พบว่าค่า P-value ของปัจจัยหลัก (main effects) น้อยกว่า 0.05 ได้แก่ ผลตะลึงปลิง กากน้ำตาลและหัวเชื้อ มีผลต่อการผลิตกรดอินทรีย์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95%

2.4 การสร้างสมการทำนายปริมาณกรดอินทรีย์จากการหมักผลตะลึงปลิง

การสร้างสมการทำนายปริมาณกรดอินทรีย์โดยนำค่าปัจจัยที่ได้จากการวิเคราะห์สัมประสิทธิ์ของสมการถดถอยของปริมาณกรดอินทรีย์จากการหมักผลตะลึงปลิง ผลการวิเคราะห์แสดงในตารางที่ 4 สมการถดถอย (regression) สามารถสร้างสมการตัวแบบอันดับที่หนึ่ง ในรูปของ codes factor ได้ตั้งสมการที่ 2 โดย Y คือ กรดอินทรีย์ ส่วนฟังก์ชันอื่นๆใช้สัญลักษณ์ A คือ ผลตะลึงปลิง B คือ น้ำ C คือ กากน้ำตาล D คือ หัวเชื้อ

$$Y = 16.14 - 1.49A + 0.17B + 1.15C - 1.80D - 0.31AB + 0.056AC - 0.084AD + 0.70 BC - 0.45BD - 0.70CD \quad (2)$$

ค่าความคลาดเคลื่อนของสัมประสิทธิ์ (coefficient estimate) ของปัจจัยแต่ละชนิด ในช่วงต่ำสุดและสูงสุดที่ความเชื่อมั่น 95% (ตารางที่ 4) พบว่าค่าสัมประสิทธิ์ของผลตะลึงปลิงอยู่ในช่วง -1.96 ถึง -1.02 น้ำอยู่ในช่วง -0.30 ถึง 0.64 กากน้ำตาล อยู่ในช่วง 0.68 ถึง 1.63 และ *Z. rouxii* TISTR 5044 อยู่ในช่วง -2.27 ถึง -1.33 และพบว่าปัจจัยทั้ง 4 ตัวแปร เป็นปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดอินทรีย์แบบส่งเสริม (positive) และขัดแย้ง (negative) โดยน้ำและกากน้ำตาล มีผลส่งเสริมการผลิตกรดอินทรีย์ในทิศทางบวก และกากน้ำตาลมีผลต่อการผลิตกรดอินทรีย์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95% ($P<0.05$) กล่าวได้ว่าถ้าเพิ่มน้ำ และกากน้ำตาล จะทำให้การผลิตกรดอินทรีย์เพิ่มขึ้น ส่วนผลตะลึงปลิงและหัวเชื้อ *Z. rouxii* TISTR 5044 เป็นปัจจัยสำคัญในทิศทางลบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95% ($P<0.05$)

ตารางที่ 4 ความคลาดเคลื่อนของค่าสัมประสิทธิ์ สำหรับแสดงสมการถดถอยแบบเส้นตรง

factor	coefficient estimate	degree of freedom	standard of error	95% CI low	95% CI high
Intercept	16.14	1	0.18	15.67	16.62
A=ผลตะลึงปลิง	-1.49	1	0.18	-1.96	-1.02
B=น้ำ	0.17	1	0.18	-0.30	0.64
C=กากน้ำตาล	1.15	1	0.18	0.68	1.63
D=หัวเชื้อ <i>Z. rouxii</i> TISTR 5044	-1.80	1	0.18	-2.27	-1.33
AB	-0.31	1	0.18	-0.78	0.16
AC	0.056	1	0.18	-0.42	0.53
AD	-0.084	1	0.18	-0.56	0.39
BC	0.70	1	0.18	0.23	1.18
BD	-0.45	1	0.18	-0.92	0.023
CD	-0.70	1	0.18	-1.18	-0.23

2.5 การสร้างพื้นผิวตอบสนองของปริมาณกรดอินทรีย์ที่ได้จากการหมักผลตะลึงปลิง

เมื่อได้สมการการทำนายปริมาณกรดอินทรีย์ที่ได้จากการหมักผลตะลึงปลิง จึงนำมาสร้างกราฟพื้นผิวตอบสนอง (response surface methodology : RSM) โดยพิจารณาจากตัวแปรที่ส่งผลต่อการผลิตกรดอินทรีย์ในน้ำหมักตะลึงปลิง ซึ่งทำนายจากกราฟเส้นโครงร่างที่สร้างจากโปรแกรมคอมพิวเตอร์ Design Expert DX 8 ของปัจจัย 2 ปัจจัยที่เกิดการ interaction กัน จากแบบจำลองที่สร้างขึ้นทำนายได้ว่าการกรดอินทรีย์ที่ผลิตได้สูงสุดมีปริมาณ 22.78 เปอร์เซ็นต์ เมื่อมีปัจจัยการหมักกรดอินทรีย์ ประกอบด้วยอัตราส่วน ผลตะลึงปลิง : น้ำ : กากน้ำตาล : *Z. rouxii* TISTR 5044 เท่ากับ 25 : 13 : 13 : 7 (ภาพที่ 4) การผลิตกรดอินทรีย์ที่ได้จากการทำนายน้อยกว่าการทดลองจริง (23.4) ซึ่งผลการทดลองจริงคลาดเคลื่อนจากการทำนาย 0.6 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นจึงควรทำการทดลองเพื่อยืนยันผลอีกครั้งในสภาวะแวดล้อมของปัจจัยดังกล่าว ในโอกาสต่อไป และจากผลการศึกษากการผลิตกรดอินทรีย์จากผลตะลึงปลิง โดยการออกแบบสูตรปัจจัยด้วยวิธีทางสถิติ ทำให้ข้อมูลที่ได้มีแบบแผนการทดลอง สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการแก้ปัญหาได้อย่างเหมาะสม ตลอดจนการแปลผลลัพธ์ การวิเคราะห์ข้อมูลด้วยคอมพิวเตอร์ทำให้ทราบว่าการควบคุมตัวแปรในการผลิต ได้แก่ วัตถุประสงค์ของสูตรปัจจัยที่ใช้ในการหมัก มีผลต่อการผลิตกรดอินทรีย์

3. ชนิดกรดอินทรีย์ในน้ำหมักผลตะลึงปลิง

ชนิดกรดอินทรีย์ในน้ำหมักผลตะลึงปลิงที่เวลาการหมัก 20 และ 40 วัน วิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC พบว่าที่เวลาการหมัก 20 วัน พบกรดมาลิก (L-malic acid) กรดซักซินิก (succinic acid) กรดแลคติก (lactic acid) และกรดอะซิติก (acetic acid) เท่ากับ 465.864, 2404.44, 2308.712 และ 1067.301 ppm. ส่วนที่เวลาการหมัก 40 วัน มีปริมาณ 507.140, 2827.442, 2064.356 และ 1325.335 ppm ตามลำดับ ปริมาณกรดอินทรีย์มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาในการหมัก โดย *Z. rouxii* TISTR 5044

Design-Expert Software

Factor Coding: Actual

organic acid

● Design points above predicted value

○ Design points below predicted value



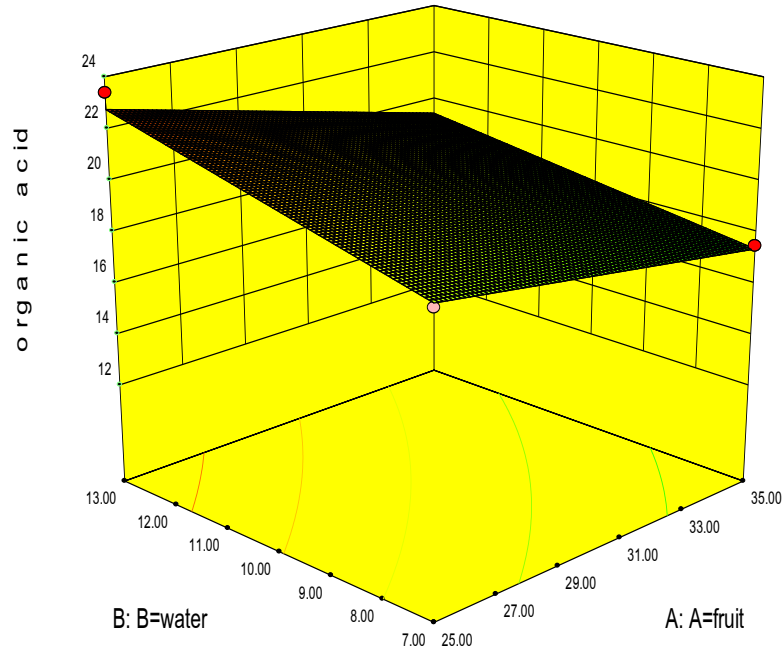
X1 = A: A=fruit

X2 = B: B=water

Actual Factors

C: C=molass = 13.00

D: D=starter = 7.00



ภาพที่ 4 พื้นผิวตอบสนองแสดงผลของการ interaction ระหว่าง น้ำกับผลตะลิงปลิงต่อการผลิตกรดอินทรีย์

4. กรดอินทรีย์จากตะลิงปลิงต่อการจับตัวของน้ำยางเพื่อใช้ทำยางก้อนถ้วย

กรดอินทรีย์จากผลตะลิงปลิงหมักในสูตรที่ 7 ประกอบด้วย ผลตะลิงปลิง : น้ำ : กากน้ำตาล : *Z. rouxii* TISTR 5044 ที่มีอัตราส่วน 25 : 13 : 13 : 7 หมักเป็นเวลา 10 วัน ปริมาตร 30 มิลลิลิตรต่อน้ำยาง 300 มิลลิลิตร ทำให้การจับตัวของน้ำยางเป็นยางก้อนถ้วยใช้เวลา 4 นาที ส่วนกรดชีวภาพทางการค้า ใช้เวลาในการแข็งตัว 5 นาที กรดฟอร์มิก ใช้เวลานานที่สุด 24 นาที (ตารางที่ 5) ลักษณะทางกายภาพของน้ำยางก้อนถ้วยมีสี ความแข็ง เพิ่มขึ้นตามปริมาณของน้ำหมัก ตะลิงปลิง และยางก้อนถ้วยที่ใช้กรดอินทรีย์จากผลตะลิงปลิงมีน้ำหนักดีกว่ากรดอินทรีย์ทางการค้าและกรดฟอร์มิก การใช้น้ำหมักชีวภาพเป็นสารจับตัวในน้ำยางมีหลักการคือ เมื่อเติมกรดอินทรีย์ลงไป ในน้ำยาง กรดจะแตกตัวให้อนุมูลไฮโดรเจน (H^+) ส่วนอนุมูลน้ำจะทำปฏิกิริยากับอนุมูลลบของคาร์บอกซิเลต ($R-COO$)⁻² ที่อยู่รอบๆ อนุภาคยางเกิดเป็นกรดไขมัน (fatty acid) ขึ้นรอบๆอนุภาคยาง กรดที่ไม่ละลายน้ำเมื่อทำปฏิกิริยากับน้ำยาง พลังยึดรอบๆอนุภาคยางจะลดลงเป็นศูนย์ ชั้นห่อหุ้มอนุภาคยางแฟบลง โมเลกุลของน้ำที่ห่อหุ้มอนุภาคยางจะเกิดการกระจายตัว น้ำยางจึงจับเป็นก้อนอย่างรวดเร็ว Baimark & Niamsa (2009) ได้ศึกษาการจับตัวน้ำยางธรรมชาติด้วยน้ำส้มควันไม้เปรียบเทียบกับกรดฟอร์มิกหรืออะซิติก พบว่าสารชีวภาพให้ผลดีในการจับตัวของน้ำยาง ยางที่ได้มีคุณสมบัติเชิงกลและความเหนียวดีกว่าการใช้กรดฟอร์มิกและอะซิติก นอกจากนี้ น้ำส้มควันไม้สามารถยับยั้งเชื้อราบนพื้นผิวยางได้ Ferreira et al. (2005) ได้ใช้กรดควัน (smoke acid) ในการทำยางแผ่น เปรียบเทียบกับกรดฟอร์มิก อะซิติก พบว่ากระบวนการจับตัวยางธรรมชาติเมื่อวิเคราะห์ทางเคมีและชีวภาพไม่แตกต่างกัน

ตารางที่ 5 ระยะเวลาการจับตัวของน้ำยางและลักษณะทางกายภาพของยางก้อนถ้วย

ปริมาณ สาร ทดสอบ (ml)	กรดอินทรีย์จากผลตะลิงปลิงหมักด้วย					กรดชีวภาพทางการค้า					กรดฟอร์มิก				
	เวลา (นาที)	น้ำหนัก (กรัม)	สี	รูปร่าง	ความ แข็ง	เวลา (นาที)	น้ำหนัก (กรัม)	สี	รูปร่าง	ความ แข็ง	เวลา (นาที)	น้ำหนัก (กรัม)	สี	รูปร่าง	ความ แข็ง
5	20	252.18	2	กลม	0.34	33	272.97	1	กลม	0.64	ไม่แข็ง	244.05	1	กลม	0.40
10	18	265.42	3	กลม	0.6	30	274.01	1	กลม	0.70	ไม่แข็ง	258.02	1	กลม	0.54
15	13	273.12	3	กลม	0.6	21.3	248.31	1	กลม	0.70	33	266.40	1	กลม	0.60
20	7	261.56	4	กลม	0.62	11.3	240.35	1	กลม	0.70	38	278.62	1	กลม	0.62
25	5	258.14	4	กลม	0.64	6	240.54	1	กลม	0.80	40	245.87	1	กลม	0.59
30	4	249.63	5	กลม	0.68	5	243.14	1	กลม	0.70	24	282.00	1	กลม	0.59

หมายเหตุ : 1 คือ สีขาว ; 2 คือ สีขาวขุ่น ; 3 คือ สีขาวอมเหลือง

สรุปผลการวิจัย

สภาวะการหมักกรดอินทรีย์จากผลตะลิงปลิงที่เหมาะสม ประกอบด้วย ผลตะลิงปลิง : น้ำ : กากน้ำตาล : หัวเชื้อ อัตราส่วน 25 : 13 : 13 : 7 หมักเป็นเวลา 10 วัน ที่อุณหภูมิห้อง ให้กรดอินทรีย์ 23.40 เปอร์เซ็นต์

ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตกรดอินทรีย์ ได้แก่ผลตะลิงปลิงและหัวเชื้อ ที่อัตราส่วนระดับสูงสุด 35 และ 13 *Z. rouxii* TISTR 5044 ผลิตกรดอินทรีย์มากกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งพบได้ในน้ำหมักตะลิงปลิงสูตรที่ 10 12 14 และ 16 มีปริมาณกรดอินทรีย์เท่ากับ 13.95 30.15 19.35 และ 11.7 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

การวิเคราะห์แบบจำลองถดถอยสามารถสร้างสมการอันดับที่หนึ่งในรูปของ codes factor ได้สมการ $Y = 16.14 - 1.49A + 0.17B + 1.15C - 1.80D - 0.31AB + 0.056AC - 0.084AD + 0.70BC - 0.45BD - 0.70CD$ (Y คือ กรดอินทรีย์ สัญลักษณ์ A คือ ผลตะลิงปลิง B คือ น้ำ C คือ กากน้ำตาล D คือ หัวเชื้อ)

การทำนายสูตรปัจจัยที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดอินทรีย์จากผลตะลิงปลิง ด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนอง กราฟเส้นของปัจจัย 2 ปัจจัย ที่เกิดการ interaction กัน ทำนายได้ว่ากรดอินทรีย์สูงสุดมีปริมาณ 22.78 เปอร์เซ็นต์ ในสูตรน้ำหมักชีวภาพที่ประกอบด้วยผลตะลิงปลิง : น้ำ : กากน้ำตาล : หัวเชื้อ อัตราส่วน 35 : 13 : 7 : 13 การผลิตกรดอินทรีย์ที่ได้จากการทำนายน้อยกว่าการทดลองจริง (23.40)

น้ำหมักตะลิงปลิงที่หมักด้วย *Z. rouxii* TISTR 5044 และกรดชีวภาพทางการค้า การจับตัวของน้ำยางใช้เวลา 5 นาที กรดฟอร์มิก ใช้เวลานานสุด 24 นาที ลักษณะทางกายภาพยางก้อนถ้วยมีสีและความแข็ง เพิ่มขึ้นตามปริมาณของน้ำหมักตะลิงปลิง กรดชีวภาพและกรดฟอร์มิก

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณทุนอุดหนุนการวิจัย งบประมาณแผ่นดินมหาวิทยาลัยราชภัฏสุราษฎร์ธานี

เอกสารอ้างอิง

- AOAC. (2000). *Official Methods of Analysis of AOAC International*. 17th ed., Maryland : USA.
- Baimark, Y., & Niamsa, N. (2009). Study on wood vinegars for use as coagulating and antifungal agents on the production of natural rubber sheets. *Biomass and Bioenergy*, 33, 994–998.
- Ferreira, V.S., Rego, I.N.C., Pastore, F., Mandai, M.M., Mendes, L.S., Santos, K.A.M., Rubim, J.C., & Suarez, P.A.Z. (2005). The use of smoke acid as an alternative coagulating agent for natural rubber sheets production. *Bioresource Technology*, 96, 605–609.
- Fernando Dinesh M.G., & Kaluarachchi C.I. (2012). Death due to adult respiratory distress syndrome following assault with rubber acid could it have been averted?. Sri Lanka Journal of Forensic Medicine. *Science and Law*, 3(1), 13–15.
- Jansen, M., Veurink, J.H., Euverink, G.W., & Dijkhuizen, L. (2003). Growth of the salt-tolerant yeast *Zygosaccharomyces rouxii* in microtiter plates: effects of NaCl, pH and temperature on growth and fusel alcohol production from branched-chain amino acids. *FEMS Yeast Research*, 3, 313–318.
- Jiménez-Quero, A., Pollet, E., Zhao, M., Marchioni, E., Averous, L., & Phalip, V. (2017). Fungal fermentation of lignocellulosic biomass for Itaconic and fumaric acid production. *Journal Microbiology Biotechnology*, 27(1), 1–8.
- John, S., Issac, J.M., & Joseph, R. (2011). Mechanical properties of natural rubber latex coagulated by a novel coagulated-yeast. *International Journal of advanced engineering sciences and technologies*, 8(2), 177–178.
- Johar, N.A.M., Hassan, M.A., Zakaria, M.R., Yee, M.R., Shirai, Y. & Ariffin, H. (2012). Evaluation of factors affecting polyhydroxyalkanoates production by *Comamonas* sp. EB172 using central composite design. *Malaysian Journal of Microbiology*, 8(3), 184–190.
- Holzappel, W.H. (2002). Appropriate starter culture technologies for small-scale fermentation in developing countries. *International Journal Food Microbiology*, 75, 197–212.
- Informer Technologies, Inc. (2017). *Design expert 8.0.7.1 trial version social advice*. Retrieved September 9, 2017, from http://softadvice.informer.com/Design_Expert_8.0.7.1_Trial_Version.html
- Kishore, K.A., & Reddy, V. (2012). Recent developments in optimization of citric acid fermentation process—A review. *International Journal of General Engineering and Technology*, 1(1), 55–63.
- Liawruangrath, P., Liawruangrath, B., & Liawruangrath, S. (2015). Determination of organic acids in avocado fermented juice by high performance liquid chromatography. *Chiang Mai Journal Science*, 42(1), 208–215.
- Lungmann, P., Choorit, W., & Prasertsan, P. (2007). Application of statistical experimental methods to optimize medium for exopolymer production by newly isolated *Halobacterium* sp. SM5. *Electronic Journal of Biotechnology*, 10(1), 1–14.

- Melo, I.R., Pimentel, M.F., Lopes, C.E., & Calazans, G.M.T. (2007). Application of fractional factorial design to levan production by *Zymomonas mobilis*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38, 45–51.
- Omay, D. & Guvenilir, Y. (2012). Lactic acid fermentation from refractory waste: Factorial design analysis. *African Journal of Biotechnology*, 11(30), 7693–7700.
- Patel, S.A., & Parikh, S.C. (2016). Production of Lactic Acid from Whey by *Lactobacillus* sp. Isolated from Local Dairy Products. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 5(5), 734–741.
- Phetphisit, W., Theangphet, P., Udeye, V., & Sa-nguanthanmmarong, P. 2012. Effect of bio-organic liquid as a rubber coagulant for natural rubber sheets production. *Naresuan University Science Journal*, 9(1), 68–79.
- Pribylova, L., de Montigny, J., & Sychrova, H. (2007). Osmoresistant yeast *Zygosaccharomyces rouxii*: the two most studied wild-type strains (ATCC 2623 and ATCC 42981) differ in osmotolerance and glycerol metabolism. *Yeast*, 24, 171–180.
- Song, H., & Lee, S.Y. (2006). Production of succinic acid by bacterial fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, 39, 352–361.
- Sundberg, C., & Jonsson, H. 2005. Preprocess inhibition due to organic acid in fed-batch composting of food waste—influence of starting culture. *Biodegradation*, 16, 205–213.
- Tekasakul, P., & Tekasakul, S. (2006). Environmental problems related to natural rubber production in Thailand. *Journal Aerosol Research*, 21(2), 122–129.