

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การคัดแยกและศึกษาคุณลักษณะของ <i>Klebsiella pneumoniae</i> LK 39 ที่ สามารถผลิตกรดมาลิกจากน้ำตาลไซโลส
หน่วยกิต	12
ผู้เขียน	นางสาวนิรนุช ช่างทอง
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร. ภัทรา ผาสอน ดร. รัตติยา แวนนุกูล
หลักสูตร	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวเคมี
สายวิชา	เทคโนโลยีชีวเคมี
คณะ	ทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี
ปีการศึกษา	2557

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกและศึกษาคุณลักษณะของแบคทีเรียที่มีความสามารถในการหมักน้ำตาลไซโลสให้เป็นกรดมาลิก โดยเก็บตัวอย่างในประเทศไทย 401 ตัวอย่าง เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว yeast extract peptone (YPX) ที่มีน้ำตาลไซโลสร้อยละ 10 (ปริมาตร/ปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มีแบคทีเรียทั้งหมด 106 ไอโซเลทที่สามารถเจริญบนอาหาร YPX ที่มีน้ำตาลไซโลสความเข้มข้นร้อยละ 10 (ปริมาตร/ปริมาตร) จากนั้นเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Basal พีเอช 7.0 ที่มีน้ำตาลไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอน และเติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 1 (น้ำหนัก/ปริมาตร) พบว่ามีแบคทีเรียที่ผลิตกรดอินทรีย์และสร้างบริเวณใส (clear zone) 3 ไอโซเลทได้แก่ LK 33, LK 34 และ LK 39 ซึ่งไอโซเลท LK 39 สามารถผลิตกรดมาลิกสูงที่สุด 60.02 กรัม/ลิตร ที่เวลา 72 ชั่วโมง แบคทีเรีย LK 39 พบว่ามีลักษณะรูปแท่ง ย้อมแกรมติดสีแดง และการพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วย 16S rRNA พบว่าไอโซเลท LK 39 มีความคล้ายคลึงกับ *Klebsiella pneumoniae* sup species ร้อยละ 99 โดยสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดมาลิกคือเลี้ยงในอาหารเหลว Basal ที่มีน้ำตาลไซโลสร้อยละ 10 (ปริมาตร/ปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอนแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 5 (น้ำหนัก/ปริมาตร) ปริมาณเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 5 (ปริมาตร/ปริมาตร) โดยปรับปริมาตรเซลล์ให้มีค่า optical density (OD_{600}) ประมาณ 0.5 (38×10^8 CFU/mL) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าความเร็ว 250 รอบ/นาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง *K. pneumoniae* LK 39 สามารถผลิตกรดมาลิกซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์หลักเพิ่มสูงขึ้นเท่ากับ

72.36 กรัม/ลิตร ค่ากำลังการผลิตเท่ากับ 0.99 กรัม/ลิตร/ชั่วโมง และ Yield เท่ากับร้อยละ 72 จากการศึกษากิจกรรมเอนไซม์ฟิวมาเลสของเชื้อ *K. pneumoniae* LK 39 ซึ่งเป็นเอนไซม์หลักที่สำคัญต่อการผลิตกรดมาลิกสามารถตรวจพบกิจกรรมของเอนไซม์ฟิวมาเลสภายในเซลล์ (intracellular) ในปริมาณที่สูงโดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่ใช้น้ำตาลไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งมีปริมาณกิจกรรมเอนไซม์ฟิวมาเลสสูงกว่าเมื่อใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน 2 เท่า นอกจากนี้พบว่าการเติมกรดซิตริก กรดไอโซซิตริก กรดไพรูวิก หรือกรดไกลออกซาลิกลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอน สามารถเพิ่มปริมาณการผลิตกรดมาลิกของเชื้อ *K. pneumoniae* LK 39 ได้ การเพิ่มความบริสุทธิ์และวิเคราะห์ชนิดของกรดอินทรีย์ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์หลักจาก *K. pneumoniae* LK 39 ด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ยืนยันว่าสารที่ *K. pneumoniae* LK 39 ผลิตได้คือกรดมาลิก งานวิจัยนี้สามารถคัดแยก *K. pneumoniae* LK 39 ซึ่งเป็นแบคทีเรียชนิดแรกในจีนัส *Klebsiella* ที่สามารถผลิตกรดมาลิกจากน้ำตาลไซโลสและใช้เป็นแนวทางในการผลิตกรดมาลิกจากน้ำตาลไซโลสได้ในอนาคต

คำสำคัญ: กรดมาลิก/น้ำตาลไซโลส/*Klebsiella pneumoniae* LK 39

Thesis Title	Isolation and Characterization of <i>Klebsiella pneumoniae</i> LK 39 Capable for Producing Malic Acid from Xylose
Thesis Credits	12
Candidate	Miss Neeranuch Changthong
Thesis Advisor	Dr. Patthra Pason Dr. Rattiya Waeonukul
Program	Master of Science
Field of study	Biochemical Technology
Department	Biochemical Technology
Faculty	School of Bioresources and Technology
Academic Year	2014

Abstract

The objective of this study is to isolate and characterize bacteria that capable of producing malic acid from xylose. A total of 401 samples were collected from various sources in Thailand and inoculated directly into yeast extract peptone (YPX) medium broth containing 10% (v/v) xylose as the carbon source at 37°C. There are 106 bacteria were able to grow in the YPX medium broth. After incubation in basal medium broth (pH 7.0) including 10% (v/v) xylose and with added 1% (w/v) CaCO₃, 3 isolates designated LK 33, LK 34 and LK 39 produced high organic acid and clear zone. The result showed that the isolate LK 39 produced the highest amount of malic acid (60.02 g/L at 72 hr). Biochemical test show that LK 39 was a rod shape, gram negative. Molecular levels nucleotide sequences of 16S rRNA showed LK 39 to be similar to *Klebsiella pneumoniae* sub species (sequence identity, 99%). The optimization condition of malic acid production are in basal medium containing of 10% (v/v) xylose as a carbon source, 5% (w/v) CaCO₃, 5% (v/v) inoculums starter and adjusted initiate OD₆₀₀ at 0.5 nm (38 x 10⁻⁸ CFU/mL) incubated at 37°C, 250 rpm for 72 hr. The *K. pneumoniae* LK 39 produced the highest amount of malic acid at 72.36 g/L, 72%yield, productivity 0.99 g/L/h. The study of fumarase activity from *K. pneumonia* LK 39 which is the key

factor for malic acid production, found that fumarase activity was investigated high as intracellular enzyme. Especially, cultivation of the *K. pneumonia* LK 39 by using xylose as a carbon source which gave the fumarase activity 2 times higher yield than glucose. Moreover, when citric acid, isocitric acid, pyruvic acid or glyoxalic acid was added in the medium contained xylose as carbon source, it could increase malic acid production. The purification and identification of organic acid from culture supernatant of *K. pneumonia* LK 39 by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) revealed that the main organic acid produced from *K. pneumonia* LK 39 is malic acid. This is the first report to isolation of *K. pneumonia* LK 39 and show that genus *Klebsiella* can produce malic acid from xylose. Moreover, this is promising microorganism for malic acid production from xylose.

Keywords: Malic acid/Xylose/*Klebsiella pneumonia* LK 39