

บทที่ 4

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 การแยกและคัดเลือกแบคทีเรีย

4.1.1 การคัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถใช้น้ำตาลไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอน

จากการเก็บตัวอย่างจากดิน (S) 126 ตัวอย่าง กองใบไม้ (LK) 41 ตัวอย่าง และดอกไม้ (FM) 29 ตัวอย่าง ภายในมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี พื้นที่การศึกษาบางขุนเทียน และผลไม้เน่าเสีย (BF) 35 ตัวอย่าง น้ำผลไม้ (BW) 27 ตัวอย่าง ผักเน่าเสีย (BV) 46 ตัวอย่าง อาหารคอง (BD) 38 ตัวอย่าง และลูกแป้งข้าวหมาก (DM) 24 ตัวอย่าง จากตลาดสี่มุมเมืองจังหวัดปทุมธานี และตัวอย่างดินจากโรงงานน้ำตาลจังหวัดราชบุรี (ML) 35 ตัวอย่าง รวมทั้งหมด 401 ตัวอย่าง (ตารางที่ 4.1) และเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว yeast extract peptone ที่มีน้ำตาลไซโลสความเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร/ปริมาตร เป็นแหล่งคาร์บอน (YPX) โดยเติมกรดโพธิ์ฟอสฟอริกร้อยละ 0.01 ปริมาตร/ปริมาตร เพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อรา นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบ/นาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สังเกตการเจริญของจุลินทรีย์ (ทำซ้ำ 2-3 รอบ) พบว่าการเจริญของจุลินทรีย์ที่สามารถใช้น้ำตาลความเข้มข้นสูงร้อยละ 10 ปริมาตร/ปริมาตร ซึ่งสังเกตจากความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นนำจุลินทรีย์ที่เจริญได้ในอาหาร YPX มาคัดแยกโคโลนีเดี่ยวโดยวิธี cross streak บนอาหารแข็ง YPX และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 วัน สามารถคัดแยกโคโลนีเดี่ยวที่เป็นแบคทีเรียและเจริญในน้ำตาลไซโลสเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร/ปริมาตร ได้ทั้งหมด 106 ไอโซเลท (ตารางที่ 4.2)

ตารางที่ 4.1 สถานที่เก็บตัวอย่าง ชนิดตัวอย่าง จำนวนตัวอย่าง และแบคทีเรียที่เจริญในอาหาร yeast extract peptone ที่มีไซโลสเข้มข้นร้อยละ 10 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

สถานที่เก็บตัวอย่าง	ชนิดตัวอย่าง (Crode)	จำนวน (ตัวอย่าง)	แบคทีเรียเดี่ยวที่ เจริญบนอาหารแข็ง YPX (ไอโซเลท)
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยี พระจอมเกล้าธนบุรี	ดิน (S)	126	30
	กองใบไม้ (LK)	41	7
	ดอกไม้ (FM)	29	5
ตลาดสี่มุมเมือง จังหวัด ปทุมธานี	ผลไม้เน่าเสีย (BF)	35	8
	น้ำผลไม้ (BW)	27	6
	ผักเน่าเสีย (BV)	46	12
	อาหารคอง (BD)	38	7
	ลูกแป้งข้าวหมาก (DM)	24	4
โรงงานน้ำตาล จังหวัด ราชบุรี	ดิน (ML)	35	27
รวม		401	106

4.1.2 การคัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตกรดอินทรีย์จากน้ำตาลไซโลสในอาหารที่มีไนโตรเจนจำกัด

นำแบคทีเรียเดี่ยวที่สามารถเจริญในอาหาร YPX เมื่อมีน้ำตาลไซโลสเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร/ปริมาตรใช้เป็นแหล่งคาร์บอน ทั้งหมด 106 ไอโซเลท จากข้อ 4.1.1 มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Basal อาหารที่มีไนโตรเจนจำกัดซึ่งเหมาะสมกับการผลิตกรดอินทรีย์ (Takeshi และคณะ, 1981) ปรับพีเอชเท่ากับ 7.0 ที่มีน้ำตาลไซโลสเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร/ปริมาตร เป็นแหล่งคาร์บอน บ่มที่

อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ความเร็ว 250 รอบ/นาที พบว่าตัวอย่างเชื้อที่มีการเจริญเติบโต (อาหารขุน) และมีค่าพีเอชในอาหารต่ำกว่าพีเอช 5.0 มีทั้งหมด 47 ไอโซเลต (ตารางที่ 4.2) ที่สามารถเจริญในอาหารเหลว Basal และเพียง 6 ไอโซเลตที่เป็นแบคทีเรียและสามารถเจริญในอาหารเหลว Basal และมีค่าพีเอชในอาหารต่ำกว่าพีเอช 5.0 (ตารางที่ 4.2)

ตารางที่ 4.2 ตัวอย่างไอโซเลตที่เจริญได้ในอาหารเหลว yeast extract peptone xylose (YPX) อาหารเหลว basal และไอโซเลตที่มีค่าพีเอชต่ำกว่า 5.0

ชนิดตัวอย่าง	จุลินทรีย์เดี่ยวที่เจริญบนอาหารแข็ง YPX (ไอโซเลต)	จุลินทรีย์ที่เจริญในอาหารเหลว Basal (ไอโซเลต)	จุลินทรีย์ที่เจริญในอาหารเหลว Basal ที่มี pH < 5.0 (ไอโซเลต)
1. ดิน (S)	27	14	ND
2. กองใบไม้ (LK)	7	5	3
3. ดอกไม้ (FM)	5	ND	1
4. ผลไม้เน่า (BF)	8	2	ND
5. น้ำผลไม้ (BW)	6	3	ND
6. เศษอาหาร (BO)	12	8	ND
7. อาหารคอง (BD)	7	ND	ND
8. ลูกแป้งข้าวหมาก (DM)	4	ND	1
9. ดิน (ML)	30	15	1
รวม	106	47	6

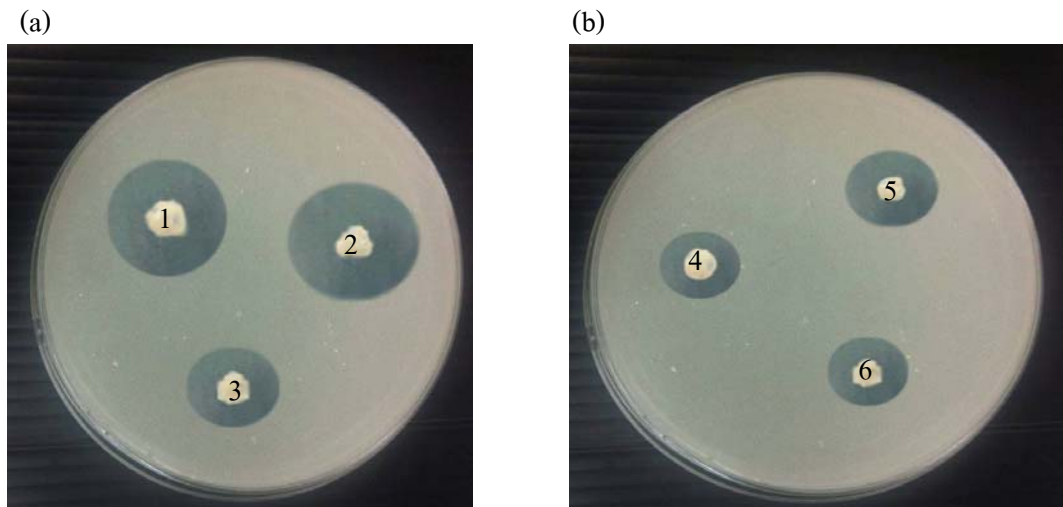
หมายเหตุ ND = Not Detection (ไม่สามารถตรวจพบ)

4.1.3 การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตกรดมาลิก

นำจุลินทรีย์ทั้ง 6 ไอโซเลทได้แก่ ได้แก่ LK 33, LK 34, LK 39, ML 5, FM 6.2, และ DM 6.3 ที่เจริญในอาหารเหลว Basal ที่มีค่าพีเอชต่ำกว่า 5.0 (ตารางที่ 4.2) มาทำสอบการสร้างกรดอินทรีย์บนอาหารแข็งที่มีแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 1 น้ำหนัก/ปริมาตร พบว่า LK 33, LK 34 และ LK 39 สามารถสร้างบริเวณใส (clear zone) สูงที่สุดโดยวัดจากค่า clear zone/colony เท่ากับ 4.00, 3.05 และ 4.33 เซนติเมตร ตามลำดับ เมื่อบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ตารางที่ 4.3, รูปที่ 4.1a และรูปที่ 4.1b) จากนั้นนำจุลินทรีย์ที่สร้างบริเวณใส (clear zone) สูงสุดไปทำการศึกษาขั้นตอนต่างๆต่อไป

ตารางที่ 4.3 ลักษณะปรากฏและความสามารถในการผลิตกรดของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้บนอาหารแข็ง Basal

Isolates	Morphology	Diameter of clear zone/colony zone
LK 33	วงกลม สีขาวขุ่น ขอบหยัก	4.00
LK 34	วงกลม สีขาวขุ่น ขอบเรียบ	3.05
LK 39	วงกลม สีขาวขุ่น ขอบเรียบ	4.33
ML 5	วงกลม สีขาวขุ่น ขอบเรียบ	2.00
FM 6.2	วงกลม สีขาวขุ่น ขอบหยัก	2.83
FM 6.3	วงกลม สีขาวขุ่น ขอบหยัก	2.45



รูปที่ 4.1 ลักษณะการเกิดบริเวณใส (clear zone) บนอาหารแข็ง Basal ที่เติมแคลเซียมแคลบอเนต ร้อยละ 1 น้ำหนัก/ปริมาตร ของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ที่มีน้ำตาลไซโลสเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร/ปริมาตร เป็นแหล่งคาร์บอน รูป a คือ 1. LK 33, 2. LK 34, 3 และ LK 39 รูป b คือ 4. ML 5, 5. FM 6.2 และ 6. DM 6.3

จากนั้นนำจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตบริเวณใสสูงที่สุดคือ LK 33, LK 34 และ LK 39 มาทดสอบผลิตกรดอินทรีย์ในอาหารเหลว Basal ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ในฟลาสขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 1 (น้ำหนัก/ปริมาตร) และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบ/นาาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และตรวจวัดชนิดกรดอินทรีย์ที่เกิดขึ้นด้วยเครื่อง HPLC จากผลการทดลองพบว่าทั้ง 3 ไอโซเลทผลิตกรดมาลิก กรดซักซินิกและกรดฟูมาลิก โดยไอโซเลท LK 39 สามารถผลิตกรดมาลิกได้สูงคือ 32.425 ± 0.527 ลำดับต่อมาก็คือ LK34 และ LK 33 สามารถผลิตกรดมาลิกได้เท่ากับ 30.903 ± 0.9508 และ 24.163 ± 0.458 กรัม/ลิตรตามลำดับ ส่วนกรดซักซินิกพบว่าไอโซเลท LK 34 ผลิตได้สูงที่สุดคือ 1.161 ± 0.037 กรัม/ลิตร และขณะที่อีก 2 ไอโซเลทสามารถผลิตกรดซักซินิกระหว่าง 0.625 - 0.837 กรัม/ลิตร ส่วนกรดฟูมาลิกทั้ง 2 ไอโซเลท ผลิตได้ปริมาณต่ำ (ตารางที่ 4.4)

ตารางที่ 4.4 ปริมาณกรดมาลิก กรดซักซินิกและกรดฟูมาลิกที่แบคทีเรียไอโซเลทต่างๆ ผลิตขึ้น

Isolates	Organic acids (g/L)		
	Malic acid	Succinic acid	Fumaric acid
LK 33	24.163±0.458	0.625 ±0.085	0.001±0.000
LK 34	30.903±0.958	1.161±0.037	0.002±0.001
LK 39	32.425±0.527	0.837±0.022	0.000

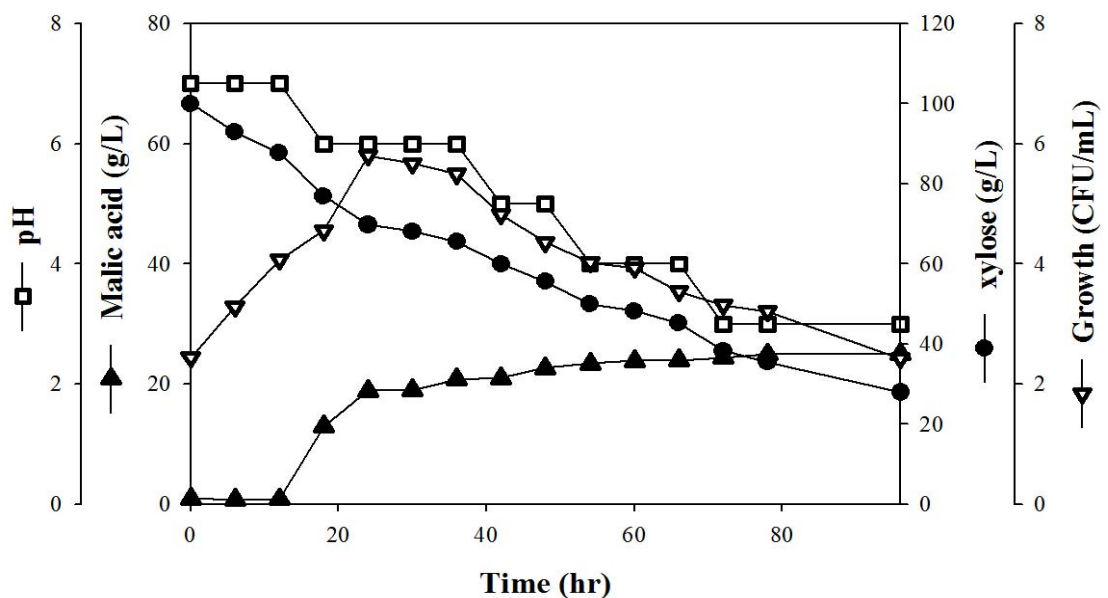
4.2 การผลิตกรดอินทรีย์

4.2.1 ศึกษาความเจริญและคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตกรดอินทรีย์

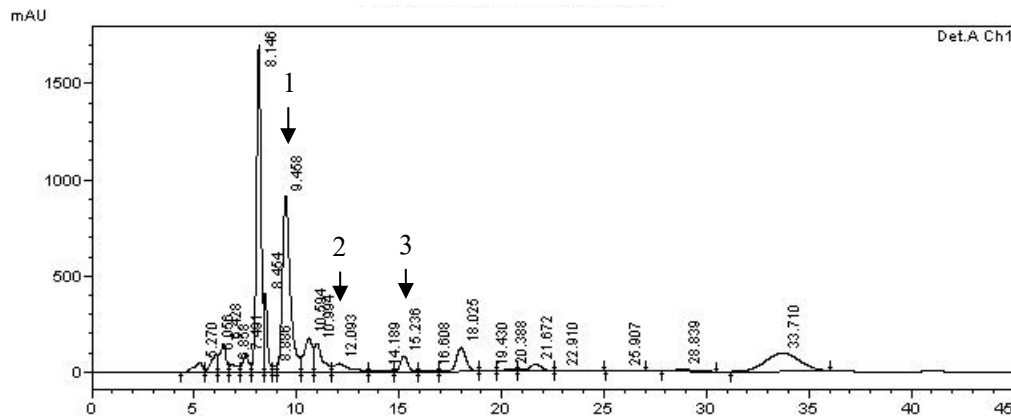
นำไอโซเลท LK 33, LK 34 และ LK 39 มาศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมและคัดเลือกไอโซเลทที่ผลิตกรดอินทรีย์ได้สูงสุด เนื่องจากทั้ง 3 ไอโซเลทสามารถเจริญในอาหารเหลวโดยมีค่า พีเอชในอาหารต่ำกว่าพีเอช 5.0 และสร้างบริเวณใส (clear zone) ขนาดใหญ่รอบโคโลนี โดยวัดค่าจาก clear zone/colony มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Basal ปริมาตร 20 มิลลิลิตรโดยมีน้ำตาลไซโลสเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร/ปริมาตร เป็นแหล่งคาร์บอน และเติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 1 น้ำหนัก/ปริมาตร (Takeshi และคณะ, 1981) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบ/นาที เก็บตัวอย่างที่ระยะเวลาต่างๆ พบว่า ไอโซเลท LK 33 มีน้ำตาลเริ่มต้นชั่วโมงที่ 0 เท่ากับ 100 กรัม/ลิตร และลดลงตามลำดับเมื่อระยะเวลาเพิ่มขึ้นในชั่วโมงที่ 96 เหลือเพียง 19.07 กรัม/ลิตร เนื่องจากจุลินทรีย์สามารถนำน้ำตาลไซโลสไปใช้ในการเจริญและการสร้างสารต่างๆ ได้ จึงทำให้ปริมาณน้ำตาลลดลงอย่างต่อเนื่อง สำหรับการเจริญช่วง lag และ log phase จะอยู่ที่ 0 - 18 ชั่วโมง ช่วง stationary phase อยู่ที่ 24 - 30 ชั่วโมง และเข้าสู่ระยะ death phase หลังชั่วโมงที่ 30

สำหรับค่าพีเอชของน้ำหมัก LK 33 เริ่มต้นชั่วโมงที่ 0 เท่ากับ 7.0 และลดลงอย่างต่อเนื่องหลังเวลา 12 ชั่วโมง และเมื่อเวลาผ่านไปเป็นเวลา 96 ชั่วโมง ค่าพีเอชจะลดลงจาก 7.0 เหลือ 3.0 ปริมาณค่าพีเอชที่ลดลงเนื่องจากจุลินทรีย์ผลิตกรดที่เพิ่มสูงขึ้นซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์จากเมตาบอลิซึมของเซลล์ โดยตรวจวัด

ปริมาณกรดอินทรีย์ที่เกิดขึ้นโดยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) และสารละลายกรดอินทรีย์มาตรฐานที่ใช้ในงานวิจัยนี้คือกรดมาลิก กรดมาโลนิค กรดซัก ซินิก กรดแล็กติก กรดอิทาโคนิก และกรดฟูมาลิก (ภาคผนวก ค.1) และอาหารเลี้ยงเชื้อ Basal ในช่วงเวลาที่ 0 เป็นชุดควบคุม (control) (ภาคผนวก ค.2) ผลการทดลองพบว่า LK 33 สามารถผลิตกรดมาลิกเป็นผลิตภัณฑ์หลักได้สูงที่สุดเท่ากับ 25.41 กรัม/ลิตร รองลงมาคือกรดซัลซินิกเท่ากับ 1.26 กรัม/ลิตร และกรดฟูมาลิกสามารถผลิตได้เพียง 0.01 กรัม/ลิตร ที่เวลา 96 ชั่วโมง (รูปที่ 4.2 และ รูปที่ 4.3) อย่างไรก็ตาม LK 33 น่าจะผลิตกรดอินทรีย์อื่นๆ ได้อีกนอกเหนือจากสารละลายมาตรฐานที่ใช้ตรวจวัด

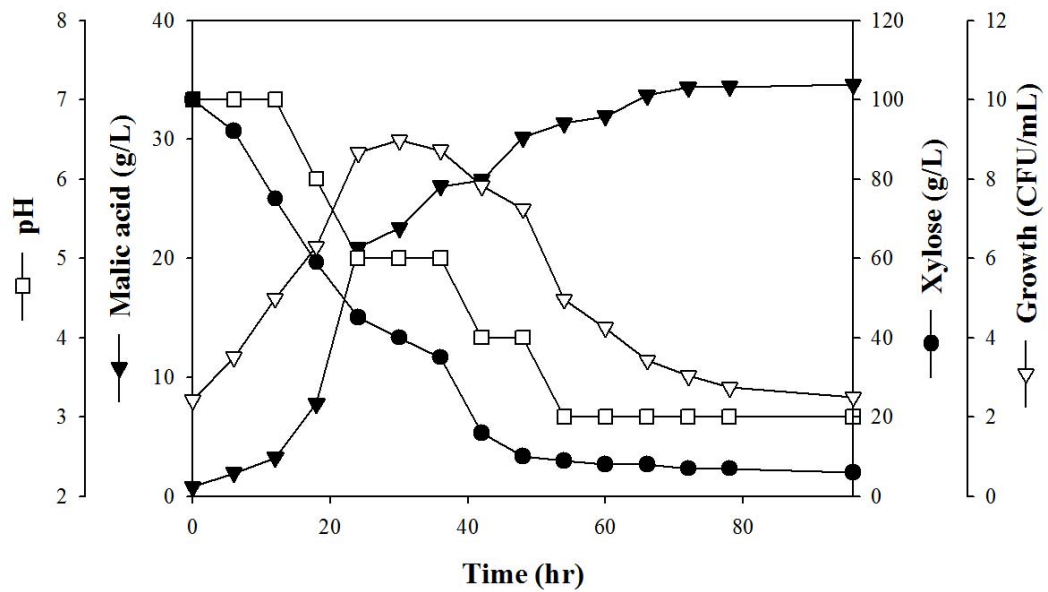


รูปที่ 4.2 รูปแบบการเจริญของแบคทีเรีย ปริมาณน้ำตาลไซโลส ฟิเอช และปริมาณกรดมาลิกของแบคทีเรียไอโซเลท LK 33 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Basal ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต ร้อยละ 1 น้ำหนัก/ปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบ/นาที

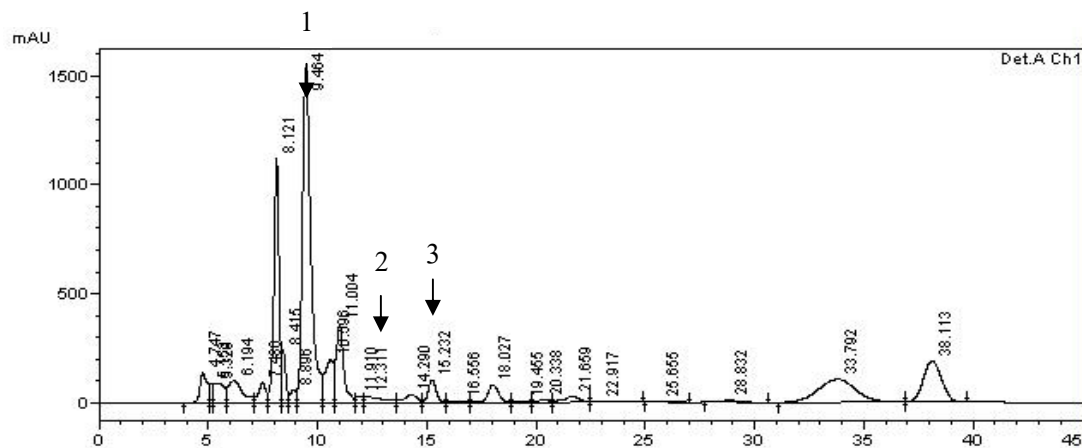


รูปที่ 4.3 โครมาโตแกรมจากเครื่อง HPLC ของจุลินทรีย์ไอโซเลท LK 33 ที่เลี้ยงในอาหารเหลว Basal ความเข้มข้นน้ำตาลไซโลสร้อยละ 10 ปริมาตร/ปริมาตร แคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 1 น้ำหนัก/ปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบ/นาที ที่เวลา 96 ชั่วโมง โดยพีคที่ 1. คือ กรดมาลิก 2. คือกรดซัลซินิก 3. คือกรดฟูมาลิก

ไอโซเลท LK 34 มีน้ำตาลเริ่มต้นชั่วโมงที่ 0 เท่ากับ 100 กรัม/ลิตร และลดลงตามลำดับเมื่อระยะเพิ่มขึ้นในชั่วโมงที่ 96 เหลือเพียง 7.65 กรัม/ลิตร เนื่องจากจุลินทรีย์สามารถนำน้ำตาลไซโลสไปใช้ในการเจริญและการสร้างสารต่างๆ ได้ จึงทำให้ปริมาณน้ำตาลลดลงอย่างต่อเนื่อง สำหรับการเจริญช่วง lag และ log phase อยู่ช่วง 0 - 18 ชั่วโมง และมีช่วง stationary phase ที่สั้นมาก และเข้าสู่ระยะ death phase ที่ชั่วโมง 24 ส่วนค่าพีเอชของน้ำหมัก LK 34 เริ่มต้นชั่วโมงที่ 0 เท่ากับ 7.0 และลดลงอย่างต่อเนื่องหลังเวลา 12 ชั่วโมง และเมื่อเวลาผ่านไปเป็นเวลา 96 ชั่วโมง ค่าพีเอชจะลดลงจาก 7.0 เหลือ 3.0 ปริมาณพีเอชที่ลดลงเนื่องจากจุลินทรีย์ผลิตกรดที่เพิ่มสูงขึ้นซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์จากเมตาบอลิซึมของเซลล์ โดยตรวจวัดปริมาณกรดอินทรีย์ที่เกิดขึ้นโดยเครื่อง HPLC ซึ่ง LK 34 สามารถผลิตกรดมาลิกเป็นผลิตภัณฑ์หลักได้สูงที่สุดเท่ากับ 35.38 กรัม /ลิตร รองลงมาคือกรดซัลซินิกเท่ากับ 0.66 กรัม/ลิตร และกรดฟูมาลิกสามารถผลิตได้เพียง 0.01 กรัม/ลิตร ที่เวลา 96 ชั่วโมง (รูปที่ 4.4 และ รูปที่ 4.5)

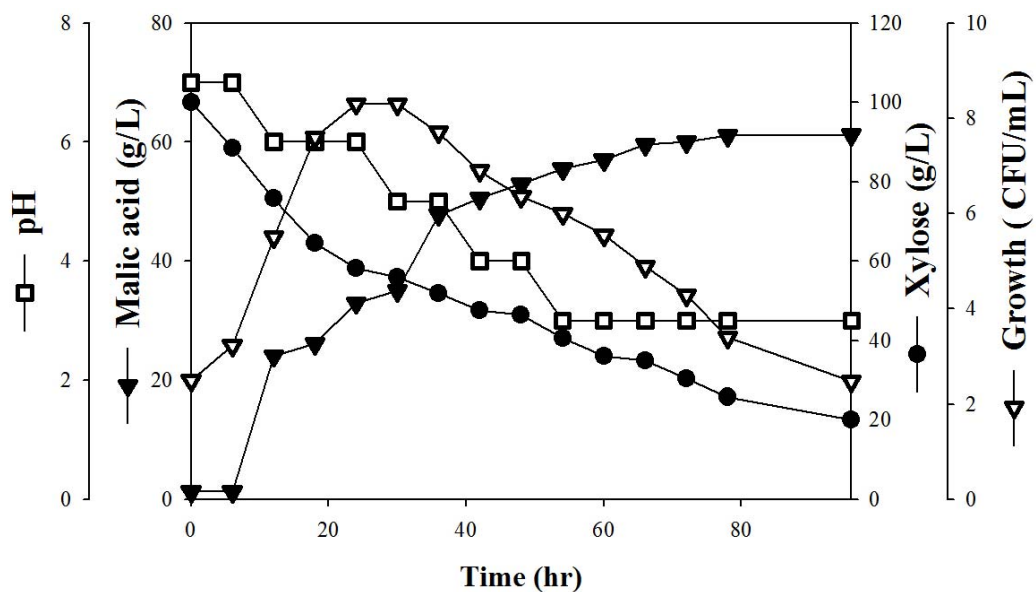


รูปที่ 4.4 รูปแบบการเจริญการเจริญของแบคทีเรีย ปริมาณน้ำตาลไซโลส พีเอช และปริมาณกรดมาลิกของแบคทีเรียไอโซเลท LK 34 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Basal ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 1 น้ำหนัก/ปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบ/นาาที

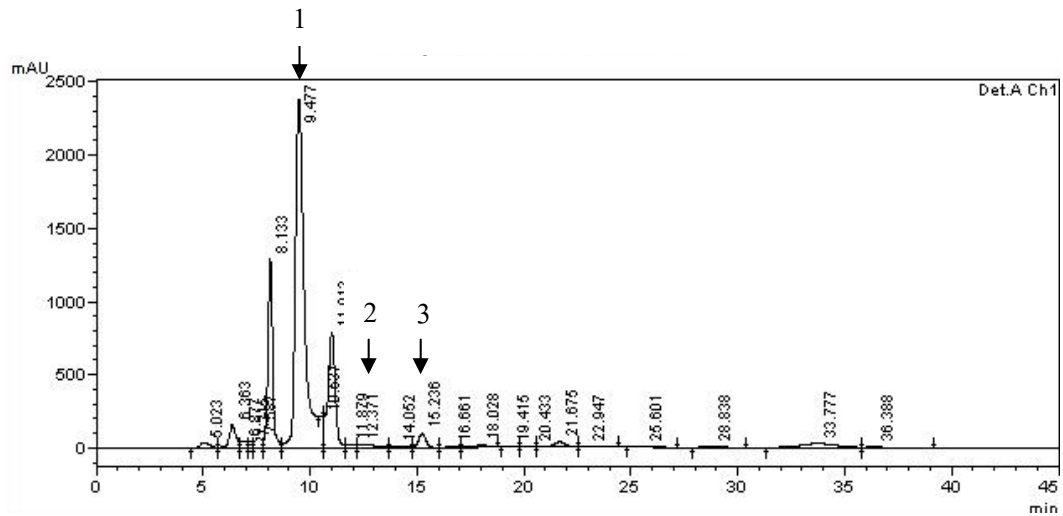


รูปที่ 4.5 โครมาโตแกรมจากเครื่อง HPLC ของจุลินทรีย์ไอโซเลท LK 34 ที่เลี้ยงในอาหารเหลว Basal ความเข้มข้นน้ำตาลไซโลสร้อยละ 10 ปริมาตร/ปริมาตร เติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 1 น้ำหนัก/ปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบ/นาาที ที่เวลา 96 ชั่วโมง โดยพีคที่ 1. คือกรดมาลิก 2. คือกรดซัลซินิก 3. คือกรดฟุมาลิก

ไอโซเลท LK 39 มีน้ำตาลเริ่มต้นชั่วโมงที่ 0 เท่ากับ 100 กรัม/ลิตร และลดลงตามลำดับเมื่อระยะเพิ่มขึ้นในชั่วโมงที่ 96 เหลือเพียง 20.13 กรัม/ลิตร เนื่องจากจุลินทรีย์สามารถนำน้ำตาลไซโลสไปใช้ในการเจริญและการสร้างสารต่างๆ ได้ จึงทำให้ปริมาณน้ำตาลลดลงอย่างต่อเนื่อง สำหรับการเจริญช่วง lag และ log phase อยู่ช่วง 0 - 18 ชั่วโมง และมีช่วง stationary phase ที่ชั่วโมง 24 – 30 และเข้าสู่ระยะ death phase หลังชั่วโมงที่ 30 ส่วนค่าพีเอชของน้ำหมัก LK 39 เริ่มต้นชั่วโมงที่ 0 เท่ากับ 7.0 และลดลงต่อเนื่องหลังชั่วโมงที่ 6 และเมื่อเวลาผ่านไปเป็นเวลา 96 ชั่วโมง ค่าพีเอชจะลดลงจาก 7.0 เหลือ 3.0 ปริมาณพีเอชที่ลดลงเนื่องจากจุลินทรีย์ผลิตกรดที่เพิ่มสูงขึ้นซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์จากเมตาบอลิซึมของเซลล์ โดยตรวจวัดปริมาณกรดอินทรีย์ที่เกิดขึ้นโดยเครื่อง HPLC ซึ่ง LK 39 สามารถผลิตกรดมาลิกเป็นผลิตภัณฑ์หลักได้สูงที่สุดเท่ากับ 61.25 กรัม/ลิตร รองลงมาคือกรดซัลซินิกเท่ากับ 0.84 กรัม/ลิตร และกรดฟูมาลิกสามารถผลิตได้เพียง 0.01 กรัม/ลิตร ที่เวลา 96 ชั่วโมง (รูปที่ 4.6 – 4.7)



รูปที่ 4.6 รูปแบบการเจริญการเจริญของแบคทีเรีย ปริมาณน้ำตาลไซโลส พีเอช และปริมาณกรดมาลิกของแบคทีเรียไอโซเลท LK 39 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Basal เดิมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 1 น้ำหนัก/ปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบ/นาที่



รูปที่ 4.7 โครมาโตแกรมจากเครื่อง HPLC ของจุลินทรีย์ไอโซเลท LK 39 ที่เลี้ยงในอาหารเหลว Basal ความเข้มข้นน้ำตาลไซโลสร้อยละ 10 ปริมาตร/ปริมาตร เดิมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 1 น้ำหนัก/ปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบ/นาที โดยพีคที่ 1. คือ กรดมาลิก 2. คือกรดซัลซินิก 3. คือกรดฟูมาลิก

จากผลการทดลองสรุปได้ว่าที่เวลา 96 ชั่วโมง LK 33, LK 34 และ LK 39 สามารถผลิตกรดมาลิกเป็นผลิตภัณฑ์หลักได้สูงที่สุดเท่ากับ 25.41, 35.38 และ 61.25 กรัม/ลิตร รองลงมาคือกรดซัลซินิกเท่ากับ 1.26, 0.66 และ 0.84 g/L และกรดฟูมาลิกทั้ง 3 ไอโซเลท สามารถผลิตได้เพียง 0.01 กรัม/ลิตร ที่เวลา 96 ชั่วโมง วิเคราะห์กรดอินทรีย์ที่เกิดขึ้นด้วยเครื่อง HPLC โดยเปรียบเทียบกับสารละลายกรดอินทรีย์มาตรฐาน (ภาคผนวก ก.1) และอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Basal ที่ชั่วโมงที่ 0 ใช้เป็นชุดควบคุม (control) (ภาคผนวก ก.2) สาเหตุที่ตรวจพบกรดมาลิกได้สูงอาจเกิดจากน้ำตาลไซโลสถูกนำเข้าสู่วัฏจักร tricarboxylic acid โดยผ่านทางวัฏจักร pentose phosphate และถูกเปลี่ยนเป็นสารตัวกลางชนิดอื่นๆ จนเกิดเป็นกรดมาลิก ซึ่งกรดมาลิกที่ผลิตและส่งออกนอกเซลล์อาจทำหน้าที่ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่น และกรดมาลิกที่เหลืออยู่ภายในเซลล์อาจทำหน้าที่เป็นสารตั้งต้นเพื่อเปลี่ยนเป็นสารอื่นๆที่เป็นประโยชน์ต่อจุลินทรีย์ (Schmidt และคณะ, 1996) หรือการผลิตกรดมาลิกอีกกระบวนการหนึ่งคือ pyruvate carboxylation – oxalacetate reduction pathway ซึ่งไพรูเวตถูกเปลี่ยนเป็นกรดออกซาโลอะซิติกและถูกเปลี่ยนเป็นกรดมาลิก และกรดมาลิกจึงถูกส่งออกนอกเซลล์ จึงทำให้ตรวจวัดปริมาณกรดมาลิกที่เกิดขึ้นได้ (Ibrar และคณะ, 2013)

ในการศึกษาขั้นตอนต่อไปในการผลิตกรดมาลิกจะเลือกไอโซเลท LK 39 เนื่องจาก สามารถผลิตกรดมาลิกได้สูงที่สุดคือ 61.25 กรัม/ลิตร เมื่อเทียบกับไอโซเลท LK 33 และ LK 34 เท่ากับ 25.41

และ 35.38 กรัม/ลิตร ตามลำดับ ซึ่งกรดมาลิกของไอโซเลท LK 39 สามารถผลิตสูงสุดในชั่วโมงที่ 96 คือ 61.25 กรัม/ลิตร และค่าผลได้เท่ากับร้อยละ 61 ค่ากำลังการผลิตเท่ากับ 0.63 กรัม/ลิตร/ชั่วโมง แต่ในชั่วโมงที่ 72 พบว่ากรดมาลิกที่ไอโซเลท LK 39 มีค่า 60.02 กรัม/ลิตรและค่าผลได้เท่ากับร้อยละ 60 ค่ากำลังการผลิตเท่ากับ 0.83 กรัม/ลิตร/ชั่วโมง (รูปที่ 4.6 – 4.7) ซึ่งมีค่าไม่แตกต่างกันกับชั่วโมงที่ 96 ดังนั้นในการทดลองขั้นตอนต่อไปจะผลิตกรดมาลิกจากไอโซเลท LK 39 โดยใช้ระยะเวลาผลิตกรดที่ 72 ชั่วโมง

4.3 การตรวจสอบลักษณะพื้นฐานวิทยาและพิสูจน์เอกลักษณ์ของจุลินทรีย์

4.3.1. การศึกษาลักษณะพื้นฐานวิทยาของจุลินทรีย์ไอโซเลท LK 39

ในการศึกษาลักษณะทางกายภาพของแบคทีเรียสายพันธุ์ LK 39 ตามวิธี Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Sneath, 2005) พบว่าลักษณะพื้นฐานวิทยานบนอาหารแข็งมีลักษณะโคโลนีเป็นวงกลม ขอบเรียบ สีขาวขุ่น (รูปที่ 4.8 a) และหลังจากการย้อมแกรม (Gram staining) และนำไปส่องกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง สามารถมองเห็นจุลินทรีย์ LK 39 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 100X มีรูปร่างแท่งและติดสีแดงของ safranin จึงจัดว่าจุลินทรีย์ไอโซเลท LK 39 เป็นแบคทีเรียแกรมลบ (รูปที่ 4.8 b)



(a)



(b)

รูปที่ 4.8 ลักษณะพื้นฐานวิทยาของแบคทีเรียไอโซเลท LK 39 บนอาหารแข็ง (a) และภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100X (b)

4.3.2 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียไอโซเลท LK 39

จำแนกแบคทีเรียที่คัดแยกได้ โดยเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับยีน 16S rRNA ที่ได้จากการสกัดดีเอ็นเอของแบคทีเรีย ซึ่งยีน 16S rRNA ถูกเพิ่มจำนวนด้วยวิธี Polymerase chain reaction (PCR) ด้วยเครื่อง DNA thermal cycle โดยใช้ 8F (5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) และ 1492R (5'ACGGCTACCTTGTTACGACTT) เป็น primers โคลนยีน 16S rRNA เข้าสู่เวกเตอร์ pGEM T – easy และ Transform เข้าสู่ *Escherichia coli* DH5 α จากนั้นสกัดพลาสมิดและส่งวิเคราะห์ลำดับเบสของจุลินทรีย์ที่คัดเลือก และเปรียบเทียบกับลำดับเบส 16S rRNA โดยใช้ฐานข้อมูลด้วยโปรแกรม BLAST ของ National Center of Biotechnology Information databases (NCBI databases) พบว่าแบคทีเรียรหัส LK 39 ที่ไอโซเลทได้คือ *Klebsiella pneumoniae* (ตารางที่ 4.5)

ตารางที่ 4.5 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้โดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA โดยใช้ฐานข้อมูลโปรแกรม BLAST ของ NCBI databases

Isolates	Type strain	Nucleotide (bp.)	Similarity (%)
LK 39	<i>Klebsiella pneumoniae</i> sup species	1,510	99

K. pneumoniae เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปแท่งและมีแคปซูล เป็นแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ทั้งสภาวะที่ใช้และไม่ใช้อากาศ (Facultative anaerobic) ไม่สามารถเรืองที่ไ้ เป็นจุลินทรีย์ที่สามารถก่อโรคได้ แต่เป็นแบคทีเรียที่จัดอยู่ในความปลอดภัยทางชีวภาพระดับ 2 (Biosafety Level 2, BSL2) ซึ่งอยู่ในกลุ่มเดียวกับ *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum*, *Staphylococcus aureus* และแบคทีเรียชนิดอื่นๆ อย่างไรก็ตามสามารถใช้ศึกษาในงานวิจัยได้หากปฏิบัติตามหลักของ BSL 1 ร่วมกับมาตรฐานความปลอดภัย การควบคุมการเข้าออกห้องปฏิบัติการ บุคลากรต้องได้รับการฝึกอบรมและใช้อุปกรณ์ความปลอดภัย เช่น ตู้ปลอดเชื้อ Class II (อากาศก่อนเข้าสู่จะกรองผ่าน HEPA filter แล้วลงสู่พื้นที่ปฏิบัติงานก่อนปล่อยออกนอกตู้) (autoclave) (คันสนีย์ ชีระพันธ์, 2555) จากรายงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่า *K. pneumoniae* สามารถผลิตสาร 1,3-propanediol ซึ่งสามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ มากมายเช่น อุตสาหกรรมยา อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง อุตสาหกรรมพอลิเมอร์และอื่นๆ เป็นต้น (Biebl และคณะ, 1999 ; Zeng และ Biebl, 2002) ดังนั้นสามารถทำงานวิจัยเกี่ยวกับ *K. pneumoniae* ได้ เนื่องจากทางห้องปฏิบัติการเอนไซม์เทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี เป็นห้องปฏิบัติการที่จัดอยู่ในความปลอดภัยทางชีวภาพระดับ 2 (Biosafety Level 2,

BSL2) ซึ่งภายในห้องปฏิบัติการมีตู้ปลอดเชื้อ Class II และผู้ปฏิบัติการผ่านการฝึกอบรมความปลอดภัยในห้องปฏิบัติการ มีการสวมถุงมือ เสื้อกาวน์กันเปื้อน รองเท้า หน้ากากกันฝุ่นละออง ก่อนเข้าห้องปฏิบัติการ และการใช้หม้อต้มฆ่าเชื้อ และสาหร่ายรูปโกกระดืบ BSL1 และ *K. pneumoniae* ยังไม่เคยมีรายงานว่าสามารถผลิตกรดมาลิกจากน้ำตาลไซโลสโดยใช้ *K. pneumoniae* ได้เลย ดังนั้นจึงสนใจเลือกทำการศึกษาแบคทีเรียที่คัดแยกได้คือ สายพันธุ์ LK 39 (*K. pneumoniae* LK39) เพื่อทำการศึกษาต่อไปโดยศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียและสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดมาลิก

4.4 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดมาลิกจากน้ำตาลไซโลส

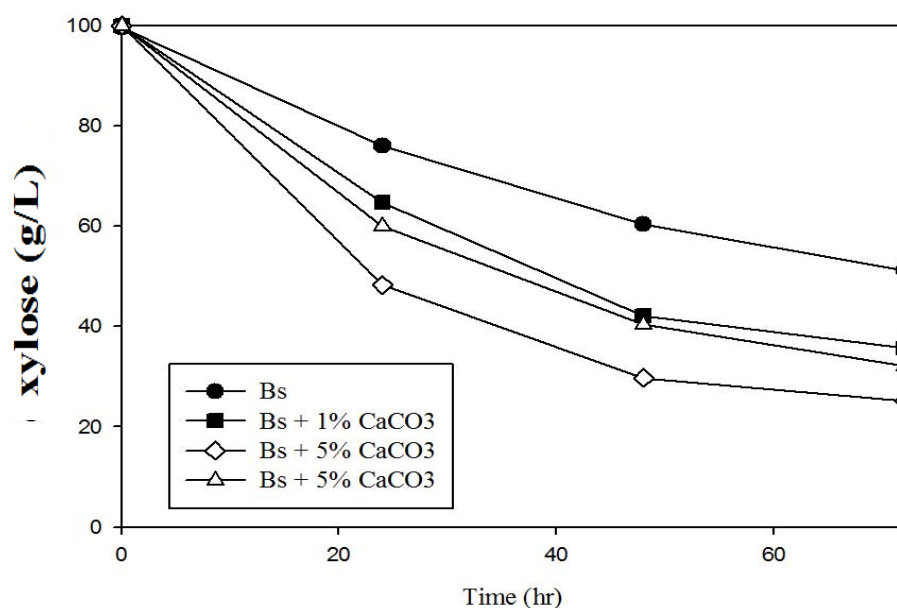
เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดมาลิกโดยมีปัจจัยต่างๆ ที่ส่งผลต่อการผลิตกรด มาลิก ยกตัวอย่างเช่น สารที่ปรับสภาพกรด – ด่าง ความเข้มข้นน้ำตาลที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอน อุณหภูมิ และอื่นๆ เป็นต้น

4.4.1 ผลของแคลเซียมคาร์บอเนตต่อการผลิตกรดมาลิกโดยเชื้อ *K. pneumoniae* LK 39

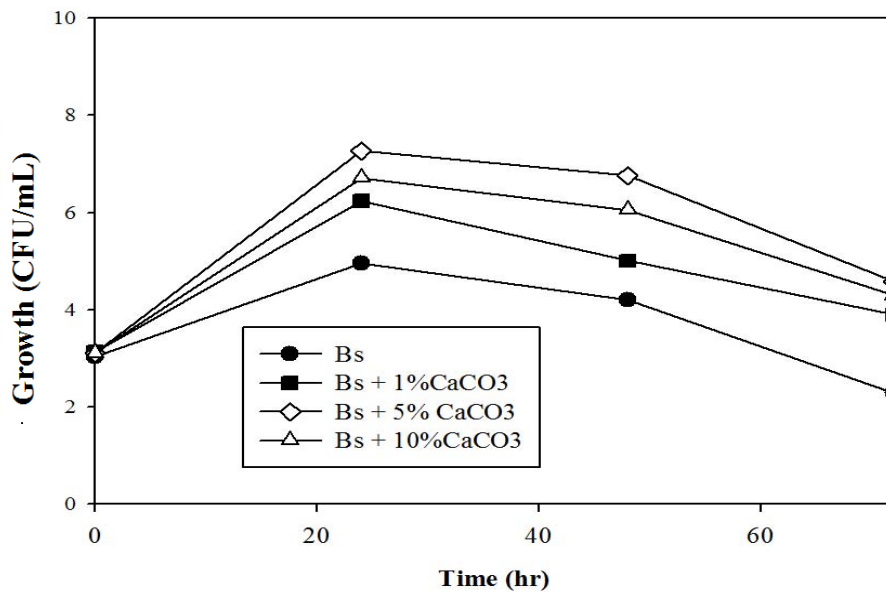
ศึกษาความสามารถในการผลิตกรดมาลิกจากจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้โดยศึกษาผลของแคลเซียมคาร์บอเนตความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ร้อยละ 1, 5 และ 10 น้ำหนัก/ปริมาตร เปรียบเทียบกับไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต ในอาหารเหลว Basal ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสร้อยละ 10 ปริมาตร/ปริมาตร จากการทดลองพบว่าทุกชุดการทดลองมีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 100 กรัม/ลิตร และเมื่อเวลาผ่านไปทุกชุดการทดลองมีปริมาณน้ำตาลลดลงเนื่องจากจุลินทรีย์สามารถนำน้ำตาลไซโลสไปใช้ในการเจริญและการสร้างสารต่างๆ รวมทั้งกรดมาลิกซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์หลัก จึงทำให้ปริมาณน้ำตาลลดลงอย่างต่อเนื่อง โดยปริมาณน้ำตาลไซโลสถูกใช้เพื่อการเจริญและการสร้างสารต่างๆ มากที่สุดเมื่อเติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 5 น้ำหนัก/ปริมาตร รองลงมาคือร้อยละ 10 และ 1 น้ำหนัก/ปริมาตร และไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตตามลำดับ ซึ่งการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตมีผลต่อการใช้น้ำตาลเพื่อการเจริญและการสร้างสารต่างๆ (รูปที่ 4.9)

เมื่อศึกษาการเจริญของแบคทีเรีย *K. pneumoniae* LK 39 พบว่าชุดการทดลองที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 5 น้ำหนัก/ปริมาตร มีการเจริญมากที่สุด รองลงมาคือร้อยละ 10, 1 น้ำหนัก/ปริมาตร และไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตตามลำดับ (รูปที่ 4.10) ทั้งนี้การเจริญของจุลินทรีย์อาจจะขึ้นกับค่าพีเอช เพราะค่าพีเอชที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของ *K. pneumoniae* คือ 6.8 (Khayati และ

คณะ, 2009) แต่ค่าพีเอชของชุดการทดลองที่ไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตและเติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 1 น้ำหนัก/ปริมาตร เมื่อเวลาผ่านไปค่าพีเอชในอาหารเลี้ยงเชื้อต่ำกว่า 6.0 ซึ่งไม่เหมาะสมกับการเจริญของเชื้อ ทำให้เชื้อเจริญได้น้อยและผลิตรวมได้ได้น้อยกว่าชุดการทดลองที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 5 และ 10 น้ำหนัก/ปริมาตร และชุดการทดลองที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 5 และ 10 น้ำหนัก/ปริมาตร จุลินทรีย์มีการเจริญอยู่ในช่วง log phase ในช่วง 0-24 ชั่วโมง และจะพบการเจริญในช่วง stationary phase ในช่วง 24-48 ชั่วโมง ที่ยาวนานกว่าชุดการทดลองที่ไม่เติมและเติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 1 น้ำหนัก/ปริมาตร เนื่องจากค่าพีเอชในระบบมีค่าเหมาะสมระหว่าง 6.0-7.0 ทำให้ *K. pneumoniae* LK 39 สามารถเจริญได้จึงพบการเจริญในช่วง stationary phase และอย่างไรก็ตามความเข้มข้นของแคลเซียมคาร์บอเนตที่เพิ่มมากขึ้นจนถึงร้อยละ 10 น้ำหนัก/ปริมาตร จะมีผลต่อการลดการเจริญของจุลินทรีย์ เพราะเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของแคลเซียมคาร์บอเนตจะทำให้ของแข็งในระบบเพิ่มมากขึ้น อาจจะทำให้ น้ำอิสระ (free water) ในระบบน้อยลง จึงทำให้ *K. pneumoniae* LK 39 ไม่สามารถนำน้ำไปใช้ในการเจริญเติบโตได้ (รูปที่ 4.10) (รังสิณี โสธรวิทย์, 2553)



รูปที่ 4.9 ปริมาณน้ำตาลไซโลสที่เปลี่ยนแปลงในอาหารเหลว Basal ของ *K. pneumoniae* LK 39 ที่น้ำตาลไซโลสเริ่มต้นร้อยละ 10 ปริมาตร/ปริมาตร เติมแคลเซียมคาร์บอเนตความเข้มข้นต่างๆ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 250 รอบ/นาที



รูปที่ 4.10 การเจริญของ *K. pneumoniae* LK 39 ในอาหารเหลว Basal ที่มีน้ำตาลไซโลสเริ่มต้น

ร้อยละ 10 ปริมาตร/ปริมาตร เติมแคลเซียมคาร์บอเนตความเข้มข้นต่างๆ บ่มที่

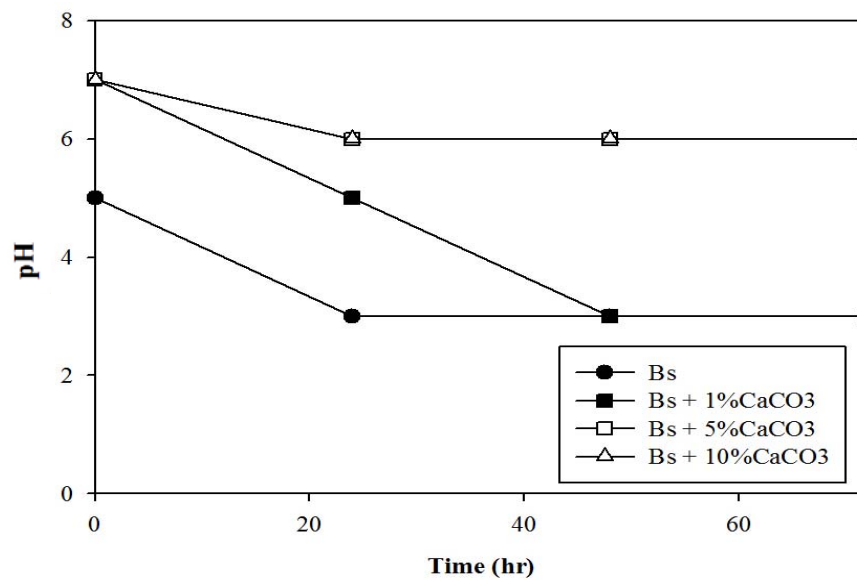
อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 250 รอบ/นาที

สำหรับค่าพีเอชที่เปลี่ยนแปลงระหว่างการเจริญและผลิตรดมาลิก จากผลการทดลองพบว่าชุดการทดลองไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต ในช่วงเวลาที่ 0 มีค่าเท่ากับ 5.0 เมื่อช่วงเวลาที่ 24 ค่าพีเอช ลดลงเท่ากับ 3.0 และคงที่ตลอดระยะเวลาการหมัก แต่ชุดการทดลองที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 1 น้ำหนัก/ปริมาตร ค่าพีเอชเริ่มต้นช่วงเวลาที่ 0 มีค่าเท่ากับ 7.0 เมื่อช่วงเวลาที่ 24 ค่าพีเอชลดลงเท่ากับ 5.0 ในช่วงเวลาที่ 48 ค่าพีเอชลดลงเท่ากับ 3.0 และคงที่ตลอดระยะเวลาการหมัก เนื่องจากการผลิตรดมาลิกจาก *K. pneumonia* LK 39 สำหรับชุดการทดลองที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 5 และ 10 พบว่าที่ช่วงเวลาที่ 0 จะมีค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7.0 และสามารถรักษาระดับความเป็นกรด-ด่างตลอดระยะเวลาการหมักในระบบให้มีค่าคงที่เท่ากับ 6.0 (รูปที่ 4.11) จากผลการทดลองนี้จึงสรุปได้ว่าเมื่อเพิ่มปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตมากขึ้นจะมีผลต่อการเจริญและผลิตรดโดยช่วยปรับค่าพีเอชเริ่มต้น และรักษาระดับพีเอชในระบบทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงน้อยที่สุด ถึงแม้ว่าจะมีการผลิตรดในปริมาณที่มากขึ้น (Lee and Holler, 1999)

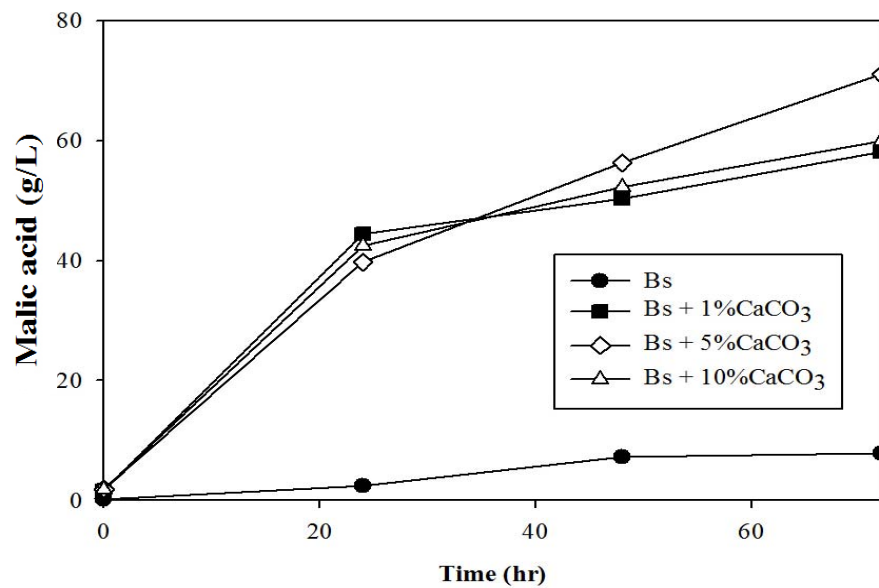
สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณกรดมาลิกที่เกิดขึ้นที่ระยะเวลาต่างๆ โดยนำอาหารเลี้ยงเชื้อมาปั่นแยกเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) ความเร็วรอบ 10,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

เป็นเวลา 10 นาที และนำส่วนใสมากรองผ่านตัวกรองขนาด 0.20 ไมครอน เพื่อนำส่วนใสมาวิเคราะห์ปริมาณกรดอินทรีย์ด้วยเครื่อง HPLC พบว่าชุดการทดลองไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตมีปริมาณกรดมาลิกน้อยกว่าการทดลองอื่นๆทุกช่วงเวลาและที่เวลา 72 ชั่วโมง มีค่า 7.79 กรัม/ลิตร และชุดการทดลองที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 1, 5 และ 10 น้ำหนัก/ปริมาตร ช่วยเพิ่มปริมาณการผลิตกรดมาลิกสูงที่สุดในชั่วโมงที่ 72 เท่ากับ 58.14, 71.06 และ 59.98 กรัม/ลิตร ตามลำดับ ดังนั้นปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตที่ความเข้มข้นร้อยละ 5 น้ำหนัก/ปริมาตร มีความเหมาะสมที่สุดในการผลิตกรดมาลิก เนื่องจากสามารถผลิตกรดมาลิกได้สูงที่สุดคือ 71.06 กรัม/ลิตร (รูปที่ 4.12 และ 4.13) จากการทดลองนี้สรุปได้ว่าปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตที่เพิ่มมากขึ้น (ร้อยละ 5 น้ำหนัก/ปริมาตร) มีส่วนช่วยในการผลิตกรดมาลิก แต่ถ้าเพิ่มแคลเซียมคาร์บอเนตมากเกินไปจนถึงร้อยละ 10 น้ำหนัก/ปริมาตร จะมีส่วนต่อการเจริญของจุลินทรีย์และการผลิตกรดมาลิก จากรายงานของ Goldberg และคณะ (2006) รายงานว่าแคลเซียมคาร์บอเนตที่เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาโดยมีส่วนช่วยในการผลิตกรดมาลิก เนื่องจากว่าแคลเซียมคาร์บอเนตจะแตกตัวเป็นคาร์บอเนไดออกไซด์และแคลเซียมประจุบวกสอง ซึ่งคาร์บอเนไดออกไซด์จะเป็นตัวช่วยทำงานร่วมกับเอนไซม์ pyruvate carboxylase เพื่อเปลี่ยน pyruvate เป็น oxaloacetate จากนั้น oxaloacetate จะถูกเปลี่ยนเป็น malate โดยเอนไซม์ cytosolic malate dehydrogenase แคลเซียมที่มาจากแคลเซียมคาร์บอเนต จะเข้าสู่เซลล์ผ่านทางช่องรับส่งแคลเซียมบริเวณผนังเซลล์จะกลายเป็นแคลเซียมมาเลทและพาแคลเซียมมาเลทออกมาจากเซลล์โดยช่องรับส่งแคลเซียมบริเวณผนังเซลล์เช่นเดิม ดังนั้นสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดมาลิกคืออาหารเลี้ยงเชื้อเหลวปริมาตร 20 มิลลิลิตร น้ำตาลไซโลสเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร/ปริมาตร แคลเซียมคาร์บอเนตเข้มข้นร้อยละ 5 น้ำหนัก/ปริมาตร เชื้อตั้งต้นร้อยละ 5 ปริมาตร/ปริมาตร และบ่มที่อุณหภูมิ 37°C ที่ความเร็ว 250 รอบ/นาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง มีปริมาณกรดมาลิกเท่ากับ 71.06 กรัม/ลิตร ค่ากำลังการผลิตเท่ากับ 0.99 กรัม/ลิตร/ชั่วโมง และค่าผลได้เท่ากับร้อยละ 71 และนอกจากนี้คาดว่า *K. pneumoniae* LK 39 ยังผลิตกรดอินทรีย์อื่นๆได้อีก แต่ไม่สามารถวิเคราะห์ได้ภายใต้สภาวะที่ทำการทดลอง ซึ่งสารละลายกรดอินทรีย์มาตรฐานประกอบด้วยกรดมาลิก กรดมาโลนิค กรดซักซินิก กรดเล็กคิต กรดอิทาโคนิก และ กรดฟูมาลิก (ภาคผนวก ก.1) และอาหารเลี้ยงเชื้อ Basal ที่ชั่วโมงที่ 0 ใช้เป็นชุดควบคุม (control) (ภาคผนวก ก.2) (รูปที่ 4.13) ซึ่งงานวิจัยนี้ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Zhang และคณะ (2011a) ศึกษาผลของการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดมาลิก พบว่าเมื่อเติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 4 น้ำหนัก/ปริมาตรลงในอาหารเลี้ยงเชื้อทำให้เชื้อ

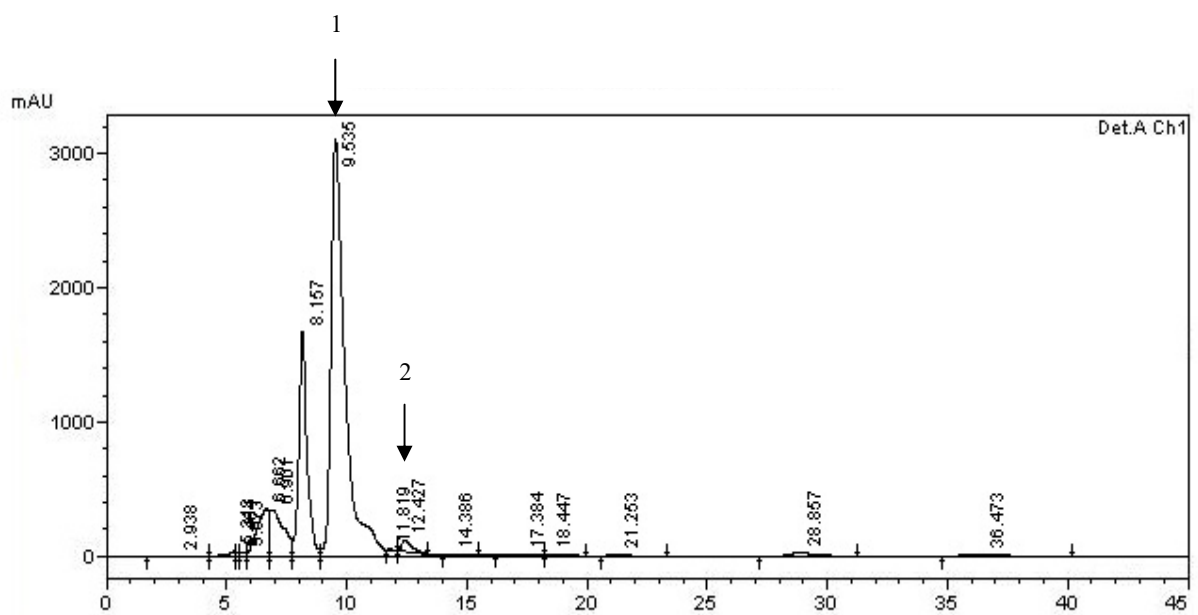
Aureobasidium pullulans ZD-3d สามารถผลิตกรดโพลีมาลิก 45.4 กรัม/ลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่ไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตซึ่งไม่สามารถผลิตกรดมาลิกได้



รูปที่ 4.11 ค่าพีเอชที่เปลี่ยนแปลงในอาหารเหลว Basal ที่มีน้ำตาลไซโลสเริ่มต้นร้อยละ 10 ปริมาตร/ปริมาตรของ *K. pneumoniae* LK 39 เติมแคลเซียมคาร์บอเนตที่ความเข้มข้นต่างๆ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 250 รอบ/นาที



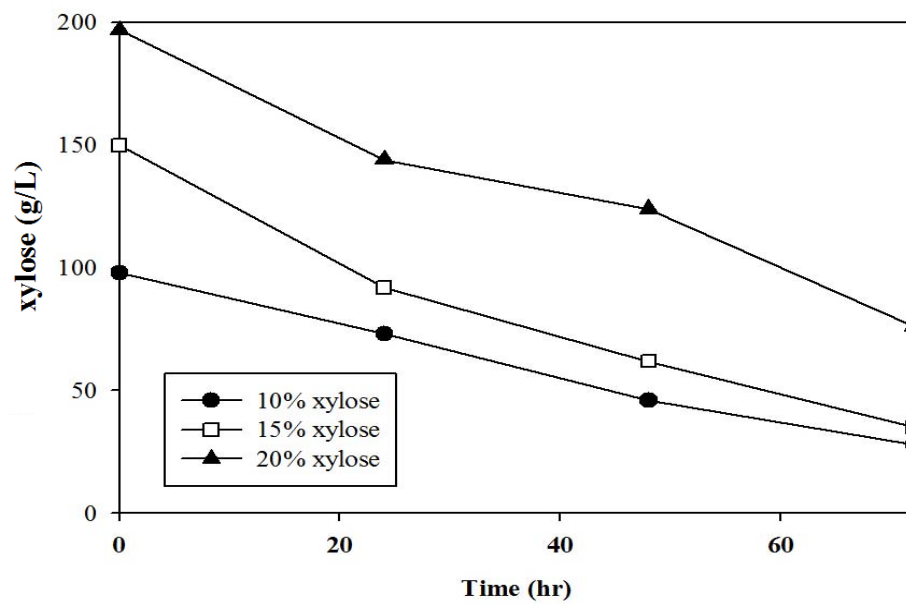
รูปที่ 4.12 การเปลี่ยนแปลงกรดมาลิกในอาหารเหลว Basal ของ *K. pneumoniae* LK 39 ที่มีน้ำตาลไซโลสเริ่มต้นร้อยละ 10 ปริมาตร/ปริมาตร และเติมแคลเซียมคาร์บอเนตที่ความเข้มข้นต่างๆ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 250 รอบ/นาที



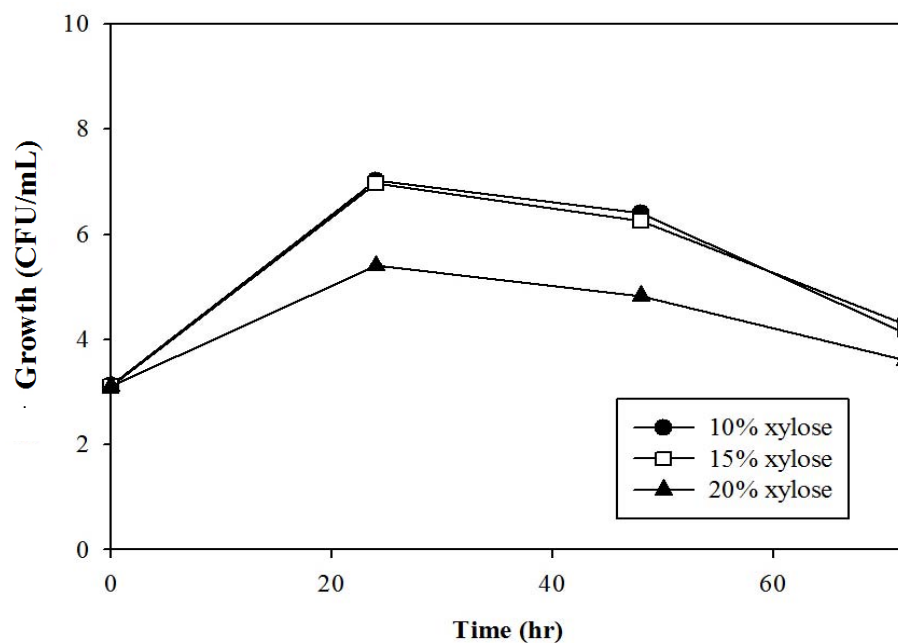
รูปที่ 4.13 โครมาโตแกรมจากเครื่อง HPLC ของ *K. pneumoniae* LK 39 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเหลว Basal ที่มีน้ำตาลไซโลสเริ่มต้นร้อยละ 10 ปริมาตร/ปริมาตร เติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 5 น้ำหนัก/ ปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบ/นาที ที่เวลา 72 ชั่วโมง โดยพีค 1. คือกรดมาลิก 2. คือกรดซัลซินิก

4.4.2 ผลของน้ำตาลไซโลสต่อการผลิตกรดมาลิกโดยเชื้อ *K. pneumoniae* LK 39

ศึกษาความสามารถในการผลิตกรดมาลิกจาก *K. pneumoniae* LK 39 โดยศึกษาผลของน้ำตาลไซโลส ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ ร้อยละ 10, 15 และ 20 ปริมาตร/ปริมาตร เติมลงในอาหาร Basal medium ที่มีความเข้มข้นของแคลเซียมคาร์บอเนตที่เหมาะสมที่สุดคือเดิมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 5 น้ำหนัก/ปริมาตรจากการทดลองข้อที่ 4.4.1 และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบ/นาที เก็บผลการทดลองที่ระยะเวลาต่างๆ จากการทดลองพบว่าปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นของความเข้มข้นร้อยละ 10, 15 และ 20 ปริมาตร/ปริมาตร ในช่วงโมเมนต์ 0 เท่ากับ 100, 150 และ 200 กรัม/ลิตร และเมื่อเวลาผ่านไปปริมาณน้ำตาลจะลดลงเนื่องจากจุลินทรีย์สามารถนำน้ำตาลไซโลสไปใช้ในการเจริญและการสร้างสารต่างๆ ได้รวมถึงกรดมาลิกซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์หลัก (รูปที่ 4.14) สำหรับน้ำตาลเริ่มต้นร้อยละ 10 และ 15 ปริมาตร/ปริมาตร พบว่าหลังจากกระบวนการหมักน้ำตาลลดลงในปริมาณใกล้เคียงกันจากเริ่มต้น 100 และ 150 กรัม/ลิตร เหลือเพียง 28.17 และ 35.03 กรัม/ลิตร และปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นร้อยละ 20 ปริมาตร/ปริมาตรลดลงน้อยที่สุด จาก 200 กรัม/ลิตร เหลือ 76 กรัม/ลิตร ซึ่งสามารถสรุปได้ว่า *K. pneumoniae* LK 39 สามารถเจริญและสร้างสารต่างๆ ได้โดยทนต่อความเข้มข้นน้ำตาลไซโลสร้อยละ 10 – 15 ปริมาตร/ปริมาตร จึงทำให้การเจริญของ *K. pneumoniae* LK 39 ที่น้ำตาลไซโลสร้อยละ 10 – 15 ปริมาตร/ปริมาตร มีการเจริญใกล้เคียงกัน แต่ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 20 ปริมาตร/ปริมาตร *K. pneumoniae* LK 39 เจริญได้น้อยลง อาจเป็นเพราะว่า *K. pneumoniae* LK 39 ไม่สามารถทนปริมาณน้ำตาลไซโลสร้อยละ 20 ปริมาตร/ปริมาตร (รูปที่ 4.15) เนื่องจากความเข้มข้นที่สูงของน้ำตาลไซโลสมีแรงดันออสโมซิสที่สูงมากอาจทำให้ถดถอยและตายได้



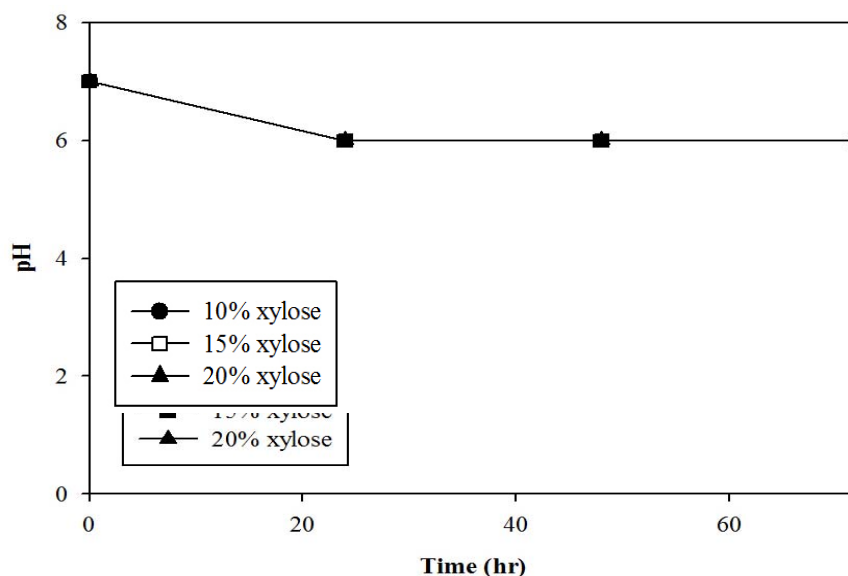
รูปที่ 4.14 การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลไซโลสที่ความเข้มข้นต่างๆในอาหารเหลว Basal ของ *K. pneumoniae* LK 39 ที่มีแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 5 น้ำหนัก/ปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 250 รอบ/นาที



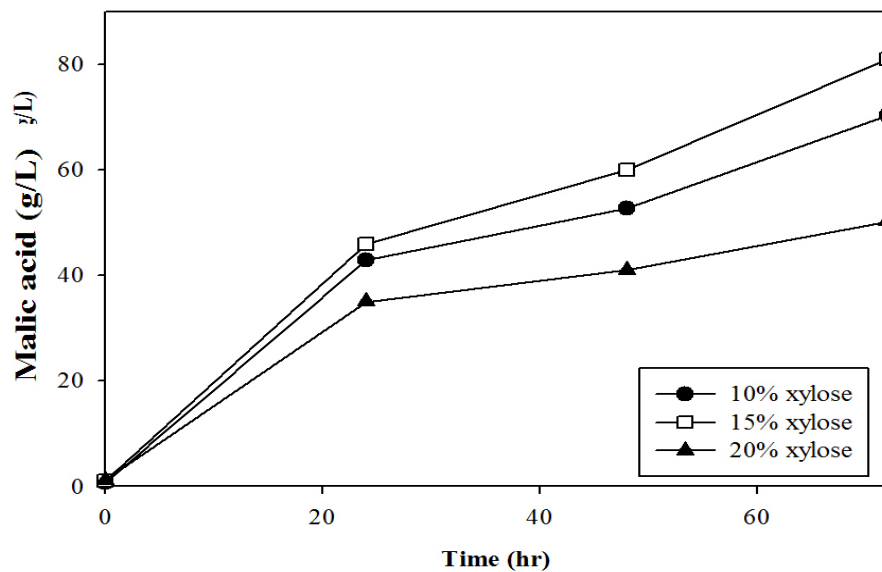
รูปที่ 4.15 การเจริญของ *K. pneumoniae* LK 39 ในอาหารเหลว Basal เมื่อใช้น้ำตาลไซโลสที่ความเข้มข้นต่างๆ เติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 5 น้ำหนัก/ปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 250 รอบ/นาที

สำหรับค่าพีเอช จากผลการทดลองพบว่าชุดการทดลองที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสร้อยละ 10, 15 และ 20 ปริมาตร/ปริมาตร และเติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 5 น้ำหนัก/ปริมาตร พบว่าที่ชั่วโมงที่ 0 จะมีค่าพีเอชเท่ากับ 7.0 และลดลงในชั่วโมงที่ 24 และจะคงที่ตลอดระยะเวลาการหมักคือ 3.0 (รูปที่ 4.16)

เมื่อวิเคราะห์หาปริมาณกรดอินทรีย์ด้วยเครื่อง HPLC พบว่าชุดการทดลองที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสร้อยละ 15 ปริมาตร/ปริมาตร มีปริมาณกรดมาลิกสูงที่สุดเท่ากับ 80.08 กรัม/ลิตร (รูปที่ 4.17) รองลงมาคือน้ำตาลไซโลสร้อยละ 10 และ 20 ปริมาตร/ปริมาตร มีปริมาณกรดมาลิกเท่ากับ 70.38 และ 50.03 กรัม/ลิตร ตามลำดับ (รูปที่ 4.17) เพราะที่น้ำตาลไซโลสร้อยละ 15 ปริมาตร/ปริมาตร มีปริมาณน้ำตาลสูงจึงทำให้เชื้อจุลินทรีย์สามารถนำน้ำตาลไปใช้ในการเจริญและการสร้างสารต่างๆ ได้มากกว่าน้ำตาลไซโลสร้อยละ 10 ปริมาตร/ปริมาตร และความเข้มข้นของน้ำตาลที่เพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 20 ปริมาตร/ปริมาตร *K. pneumoniae* LK 39 มีการผลิตกรดมาลิกได้น้อยลง อาจเป็นเพราะว่า *K. pneumoniae* LK 39 ไม่สามารถเจริญได้ในปริมาณน้ำตาลไซโลสร้อยละ 20 ปริมาตร/ปริมาตร (รูปที่ 4.15)



รูปที่ 4.16 ค่าพีเอชที่เปลี่ยนแปลงในอาหารเหลว Basal ของ *K. pneumoniae* LK 39 เมื่อใช้น้ำตาลไซโลสที่มีความเข้มข้นต่างๆ เติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 5 น้ำหนัก/ปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 250 รอบ/นาที



รูปที่ 4.17 การเปลี่ยนแปลงกรดมาลิกในอาหารเหลว Basal ของ *K. pneumoniae* LK 39 เมื่อใช้น้ำตาลไซโลสที่ความเข้มข้นต่างๆ เติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 5 น้ำหนัก/ปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 250 รอบ/นาที

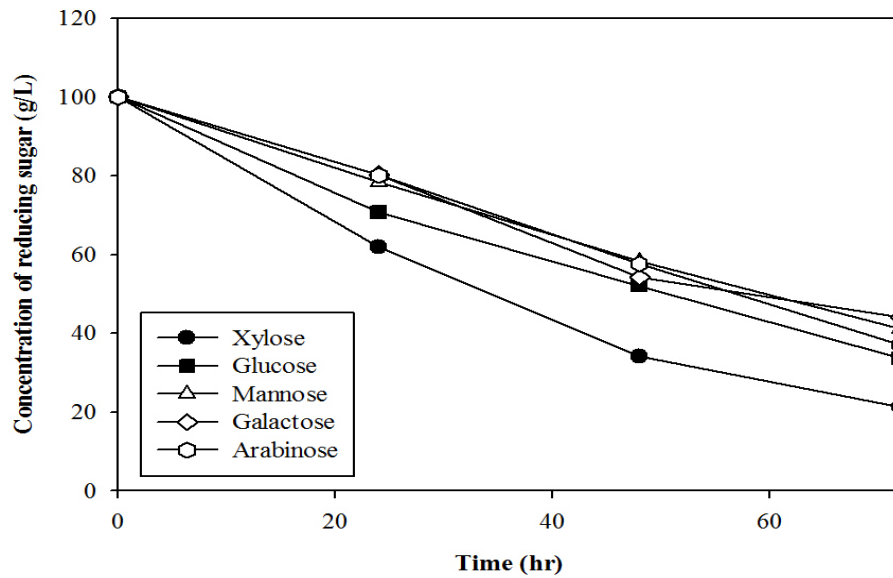
จากผลการทดลองชุดการทดลองที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสร้อยละ 15 ปริมาตร/ปริมาตร (150 กรัม/ลิตร) มีปริมาณกรดมาลิกสูงที่สุดเท่ากับ 80.08 กรัม/ลิตร (รูปที่ 4.17) แต่เมื่อนำมาคิดค่ากำลังการผลิตเท่ากับ 1.10 กรัม/ลิตร/ชั่วโมง ค่าผลได้เท่ากับร้อยละ 53 และเมื่อเปรียบเทียบกับค่าผลได้ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสร้อยละ 10 ปริมาตร/ปริมาตร ซึ่งสามารถผลิตกรดมาลิกเท่ากับ 70.38 กรัม/ลิตร เมื่อคิดค่าผลได้จะเท่ากับร้อยละ 70 เมื่อนำไปประยุกต์ใช้ในโรงงานอุตสาหกรรมนั้นจะวิเคราะห์เฉพาะค่าผลได้ ซึ่งหมายถึงการนำสับเซตทไปใช้ในการผลิตผลิตภัณฑ์ได้อย่างสูงสุด ทำให้รักษาดัชนีทุนในการผลิตได้ ดังนั้นสถานะที่เหมาะสมในการผลิตกรดมาลิกคือความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสร้อยละ 10 ปริมาตร/ปริมาตร เนื่องจากมีค่าผลได้มากกว่าการใช้น้ำตาลไซโลสเริ่มต้นร้อยละ 15 ปริมาตร/ปริมาตร แคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 5 น้ำหนัก/ปริมาตร เชื้อตั้งต้นร้อยละ 5 ปริมาตร/ปริมาตร และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่ความเร็ว 250 รอบ/นาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง มีปริมาณกรดมาลิกเกิดขึ้นเท่ากับ 70.38 กรัม/ลิตร ค่ากำลังการผลิตเท่ากับ 0.97 กรัม/ลิตร/ชั่วโมง และค่าผลได้เท่ากับร้อยละ 70

4.4.3 ผลของชนิดของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตกรดมาลิกโดยเชื้อ *K. pneumoniae* LK 39

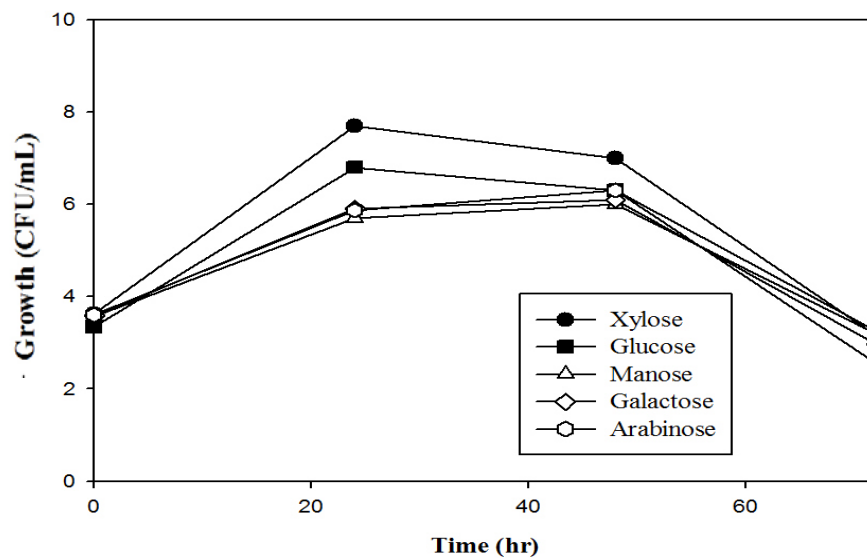
4.4.3.1 ผลของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอน

ศึกษาความสามารถในการผลิตกรดมาลิกจากแหล่งคาร์บอนที่เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว โดยเตรียมอาหารเหลว Basal และความเข้มข้นของแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 5 น้ำหนัก/ปริมาตร และเติมน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวชนิดต่างๆ ได้แก่ น้ำตาลไซโลส อะราบิโนส กลูโคส แมนโนส กาแล็คโตส ที่ความเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร/ปริมาตร หลังจากการเลี้ยงเชื้อและเก็บตัวอย่างที่ระยะเวลาต่างๆ พบว่าปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 100 กรัม/ลิตร เมื่อเวลาผ่านไปปริมาณน้ำตาลลดลงเนื่องจากจุลินทรีย์สามารถนำน้ำตาลไปใช้ในการเจริญและสร้างสารต่างๆ ได้รวมถึงกรดมาลิก (รูปที่ 4.18) เมื่อเปรียบเทียบผลของการใช้น้ำตาลชนิดต่างๆ พบว่าปริมาณน้ำตาลไซโลสลดลงมากกว่าน้ำตาลอื่นๆ เหลือเพียง 20 กรัม/ลิตร จากน้ำตาลไซโลสเริ่มต้น 100 กรัม/ลิตร เนื่องจาก *K. pneumoniae* LK 39 สามารถนำน้ำตาลไปใช้ในการเจริญและสร้างสารต่างๆ ได้มากกว่าน้ำตาลกลูโคส อะราบิโนส แมนโนส กาแล็คโตส ตามลำดับ

เมื่อวัดความเจริญพบว่า *K. pneumoniae* LK 39 เจริญได้ดีในน้ำตาลไซโลส รองลงมาคือน้ำตาลกลูโคส น้ำตาลอะราบิโนส น้ำตาลแมนโนส และน้ำตาลกาแล็คโตส ตามลำดับ โดยน้ำตาลทุกชนิดมีช่วง log phase อยู่ในช่วง 0 - 24 ชั่วโมง จากนั้นจะเข้าสู่ stationary phase ในช่วง 24-28 ชั่วโมงและเข้าสู่ระยะ death phase หลังจากชั่วโมงที่ 48 (รูปที่ 4.19) จากผลการทดลองสรุปได้ว่า *K. pneumoniae* LK 39 สามารถเจริญและทนปริมาณน้ำตาลไซโลสที่ความเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร/ปริมาตร ได้ดีกว่าปริมาณน้ำตาลชนิดอื่นๆ จึงสามารถใช้น้ำตาลและการเจริญได้ดีกว่าน้ำตาลชนิดอื่นๆ เพราะจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์สามารถทนความเข้มข้นของน้ำตาลแต่ละชนิดได้ไม่เท่ากัน และถ้าปริมาณความเข้มข้นของน้ำตาลมากเกินไปอาจจะยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์



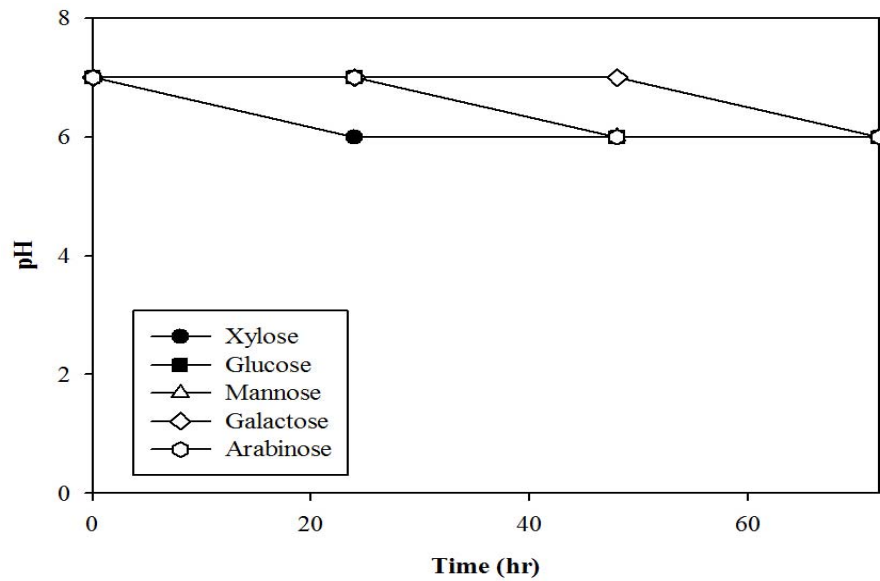
รูปที่ 4.18 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เปลี่ยนแปลงในอาหารเหลว Basal ของ *K. pneumoniae* LK 39 ที่เติมน้ำตาลชนิดต่างๆเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร/ปริมาตร เติมนิโคตินิกแอซิดร้อยละ 5 น้ำหนัก/ปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 250 รอบ/นาที



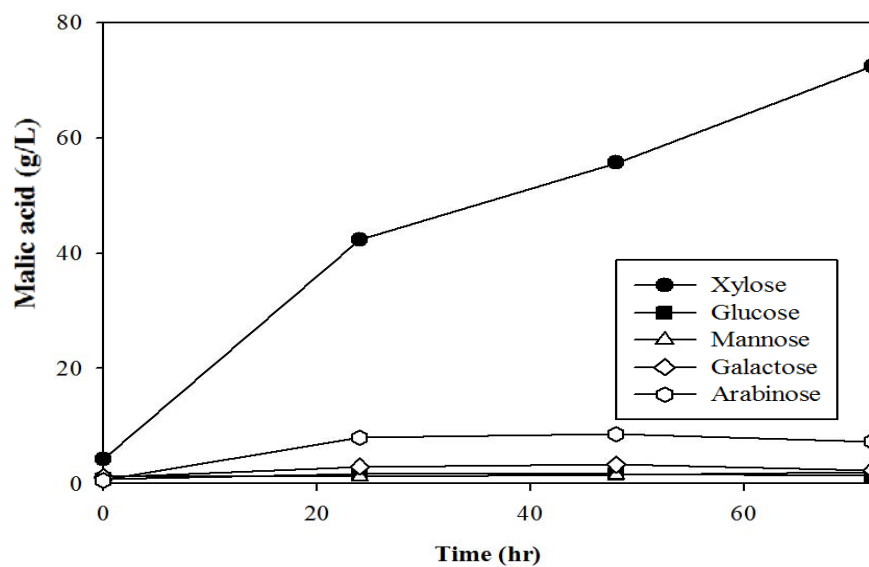
รูปที่ 4.19 การเจริญของ *K. pneumoniae* LK 39 ในอาหารเหลว Basal ที่เติมน้ำตาลชนิดต่างๆเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร/ปริมาตร เติมนิโคตินิกแอซิดร้อยละ 5 น้ำหนัก/ปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 250 รอบ/นาที

สำหรับค่าพีเอช จากผลการทดลองพบว่าชุดการทดลองของน้ำตาลทุกชนิดจะมีค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7.0 และน้ำตาลไซโลสจะมีค่าพีเอชลดลงในช่วงเวลาที่ 24 เท่ากับ 6.0 และคงที่ตลอดระยะเวลาการหมัก ส่วนน้ำตาลกลูโคส แมนโนส อะราบินอส จะมีค่าพีเอช 7.0 ในช่วงเวลาที่ 0 – 24 ชั่วโมง และจะลดลงเท่ากับ 6.0 ในช่วงเวลาที่ 48 และคงที่จนถึงชั่วโมงที่ 72 และน้ำตาลกาแล็คโตสจะมีค่าพีเอช 7.0 ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0-48 ชั่วโมงและจะลดลงเหลือพีเอช 6.0 ในช่วงเวลาที่ 72 (รูปที่ 4.20) ซึ่งจากผลการทดลองจะเห็นว่าค่าพีเอชของน้ำตาลไซโลสลดลงมากกว่าน้ำตาลชนิดอื่นๆ เนื่องจากปริมาณกรดมาลิกที่ผลิตได้จากน้ำตาลไซโลสมีค่าสูงกว่าปริมาณน้ำตาลชนิดอื่น (รูปที่ 4.21)

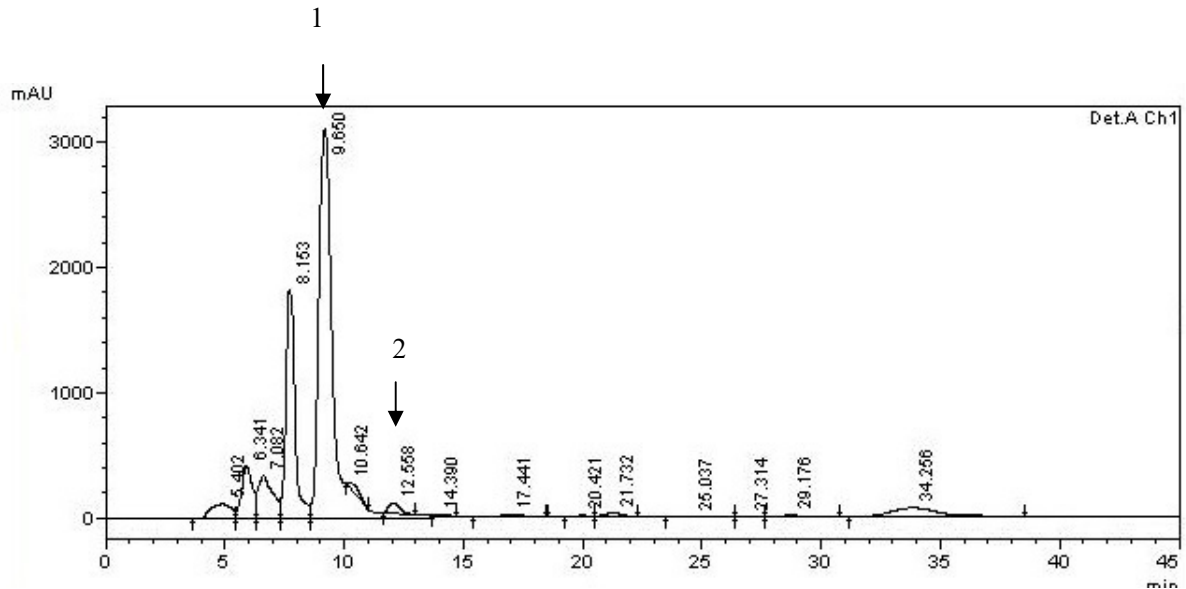
เมื่อวิเคราะห์ปริมาณกรดอินทรีย์ด้วยเครื่อง HPLC พบว่าชุดการทดลองที่มีน้ำตาลไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอนมีปริมาณกรดมาลิกสูงที่สุดเท่ากับ 72.36 กรัม/ลิตร ส่วนน้ำตาลอื่นๆ ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลกาแล็คโตส น้ำตาลแมนโนส และน้ำตาลอะราบินอส มีปริมาณกรดมาลิกใกล้เคียงกันและน้อยกว่าน้ำตาลไซโลส (รูปที่ 4.21) ทั้งนี้อาจเป็นเพราะว่าน้ำตาลไซโลสไปเหนี่ยวนำยีนต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตกรดมาลิกให้มีการแสดงออกของยีนมากขึ้น จึงทำให้ผลิตกรดมาลิกได้ปริมาณมากเมื่อเทียบกับแหล่งคาร์บอนชนิดอื่นๆ ดังนั้นสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดมาลิกคือ อาหารเหลว Basal ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสร้อยละ 10 ปริมาตร/ปริมาตร แกลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 5 น้ำหนัก/ปริมาตร เชื้อจุลินทรีย์ตั้งต้นร้อยละ 5 ปริมาตร/ปริมาตร และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เวลา 250 รอบ/นาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง มีปริมาณกรด มาลิกเท่ากับ 72.36 กรัม/ลิตร ค่ากำลังการผลิตเท่ากับ 0.99 กรัม/ลิตร/ชั่วโมง และค่าผลได้เท่ากับร้อยละ 72 (รูปที่ 4.21-4.22)



รูปที่ 4.20 ค่าพีเอชที่เปลี่ยนแปลงในอาหารเหลว Basal ของ *K. pneumoniae* LK 39 ที่เติมน้ำตาลชนิดต่างๆเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร/ปริมาตร เติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 5 น้ำหนัก/ปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 250 รอบ/นาที



รูปที่ 4.21 การเปลี่ยนแปลงกรดมาลิกในอาหารเหลว Basal ของ *K. pneumoniae* LK 39 ที่เติมน้ำตาลชนิดต่างๆ ที่ความเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร/ปริมาตร เติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 5 น้ำหนัก/ ปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว รอบ 250 รอบ/นาที



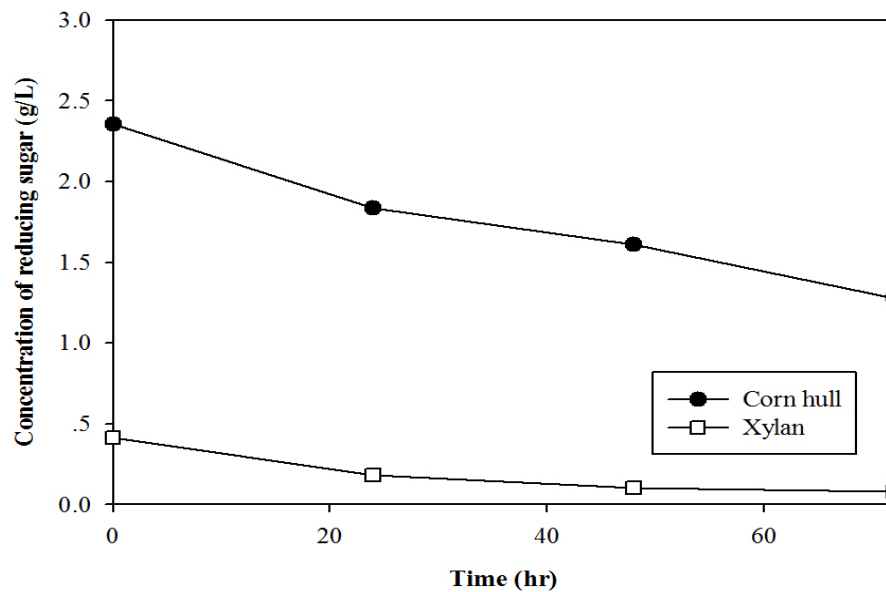
รูปที่ 4.22 โครมาโตแกรมจากเครื่อง HPLC ของ *K. pneumoniae* LK 39 ที่เลี้ยงในอาหารเหลว Basal ที่มีน้ำตาลไซโลสเริ่มต้นร้อยละ 10 ปริมาตร/ปริมาตร เติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 5 น้ำหนัก/ปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่เวลา 72 ชั่วโมง ความเร็ว 250 รอบ/นาท โดยพีคที่ 1. คือกรดมาลิก 2. คือกรดซักซินิก

4.4.3.2 ผลของพอลิเมอร์ที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอน

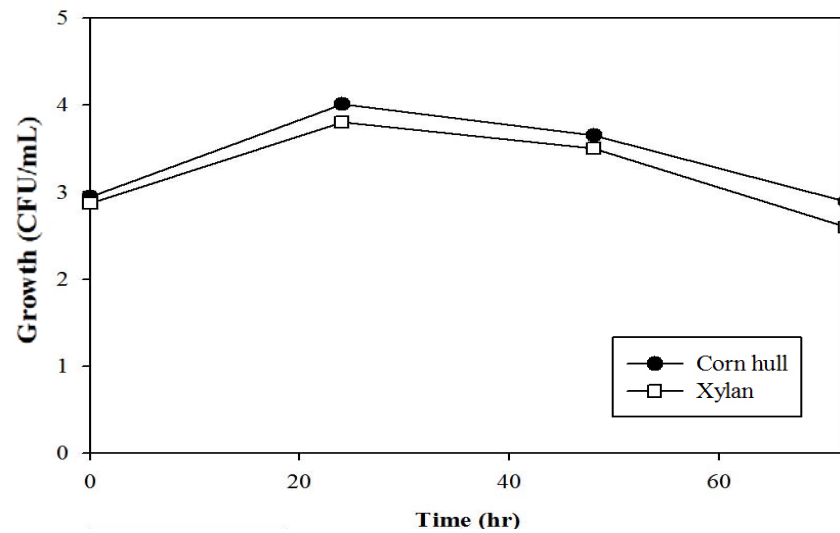
ศึกษาความสามารถในการผลิตกรดมาลิกจากแหล่งคาร์บอนที่เป็นพอลิเมอร์ของน้ำตาลไซโลส ได้แก่ ไซเลนและเปลือกข้าวโพด ที่เติมลงในอาหารเหลว Basal และแคลเซียมคาร์บอเนตที่เหมาะสมที่สุด คือร้อยละ 5 น้ำหนัก/ปริมาตรจากข้อ 4.4.1 โดยใช้ไซเลนและเปลือกข้าวโพดที่ความเข้มข้นร้อยละ 1 น้ำหนัก/ปริมาตร เป็นแหล่งคาร์บอน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 250 รอบ/นาท จากการทดลองพบว่าปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นของเปลือกข้าวโพด และไซเลนจาก birch wood เท่ากับ 2.35 และ 0.41 กรัม/ลิตร ตามลำดับ และเมื่อเวลาผ่านไปปริมาณน้ำตาลเริ่มลดลงเนื่องจากจุลินทรีย์สามารถนำน้ำตาลไปใช้ในการเจริญและการสร้างสารต่างๆ ได้รวมถึงกรดมาลิกได้น้อย (รูปที่ 4.23)

เมื่อวัดการเจริญพบว่า *K. pneumoniae* LK 39 เจริญได้น้อยทั้งในเปลือกข้าวโพดและไซเลน โดยจะพบการเจริญแบบ log phase อยู่ในช่วง 0 – 24 ชั่วโมง และ stationary phase ที่สั้นมากและจะเข้าสู่ death phase หลังชั่วโมงที่ 24 ซึ่ง *K. pneumoniae* LK 39 สามารถเจริญในเปลือกข้าวโพดได้ดีกว่าไซเลน เนื่องจากในเปลือกข้าวโพดมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มากกว่าในไซเลน จึงทำให้ *K. pneumoniae* LK 39 สามารถนำน้ำตาลไปใช้ในการเจริญและการสร้างสารต่างได้มากกว่าไซเลน (รูปที่ 4.24)

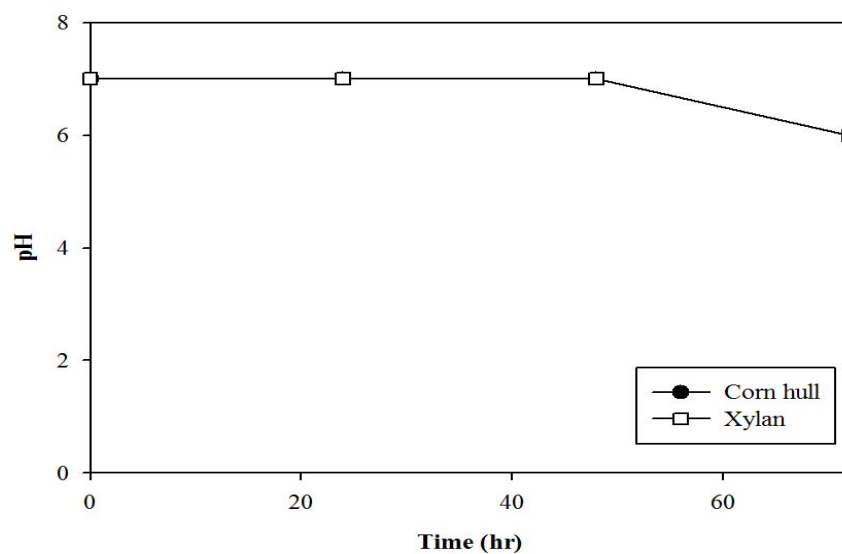
สำหรับค่าพีเอชจากการทดลองพบว่าทั้งเปลือกข้าวโพดและไซแลนจะมีค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7.0 และจะลดลงเท่ากับพีเอช 6.0 ที่ชั่วโมง 72 (รูปที่ 4.25) เนื่องจากปริมาณกรดต่างๆรวมถึงกรดมาลิกที่ผลิตได้จากเปลือกข้าวโพดและไซแลนผลิตได้ค่อนข้างต่ำ จึงทำให้ระบบสามารถรักษาระดับพีเอช และเกิดการเปลี่ยนแปลงน้อยที่สุด



รูปที่ 4.23 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เปลี่ยนแปลงในอาหารเหลว Basal ของ *K. pneumoniae* LK 39 ที่มีเปลือกข้าวโพดและไซแลนเข้มข้นร้อยละ 1 น้ำหนัก/ปริมาตร เป็นแหล่งคาร์บอน และเติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 5 น้ำหนัก/ปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบ/นาที



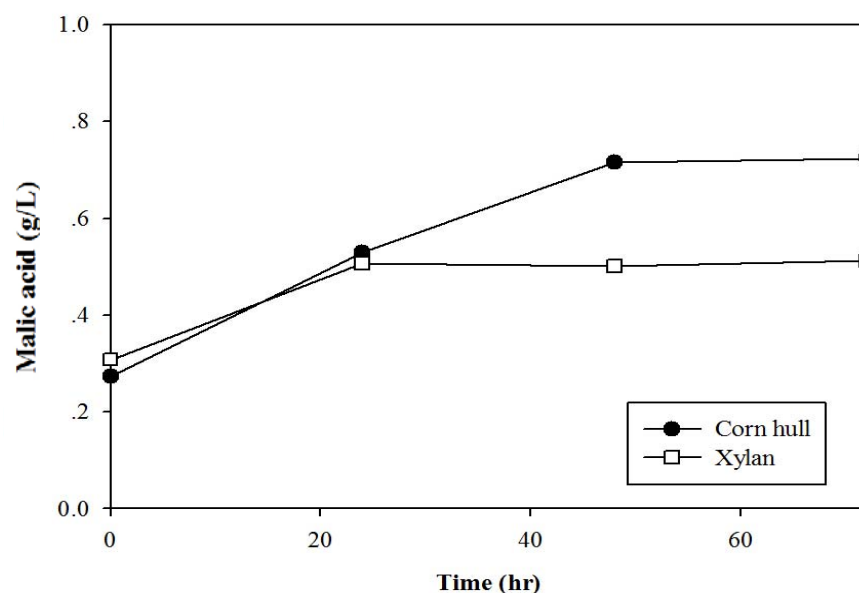
รูปที่ 4.24 การเจริญของของ *K. pneumoniae* LK 39 ในอาหารเหลว Basal ที่มีเปลือกข้าวโพดและไซเลนเข้มข้นร้อยละ 1 น้ำหนัก/ปริมาตร เดิมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 5 น้ำหนัก/ปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบ/นาที



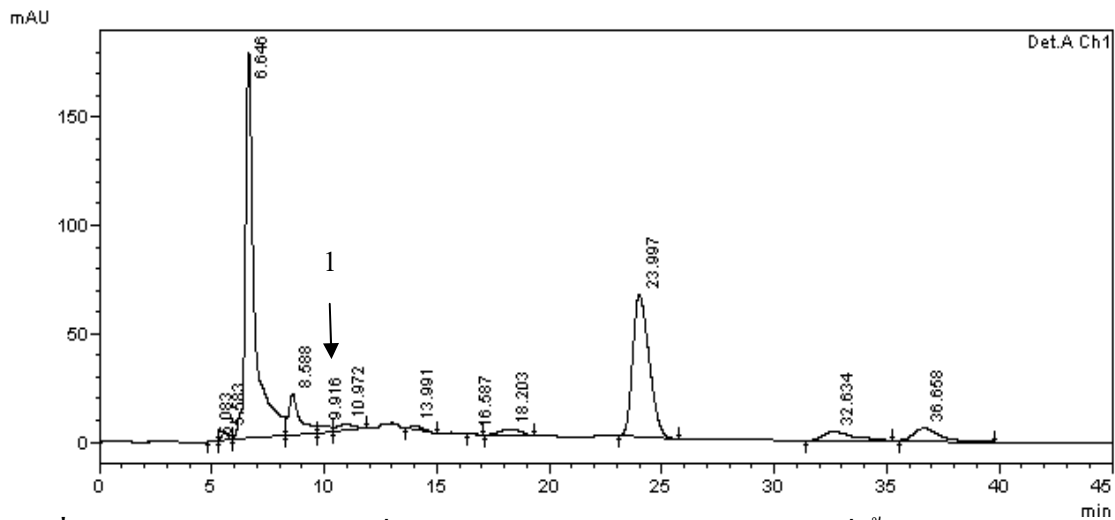
รูปที่ 4.25 ค่าพีเอชที่เปลี่ยนแปลงในอาหารเหลว Basal ของ *K. pneumoniae* LK 39 ที่มีเปลือกข้าวโพด และไซเลนเข้มข้นร้อยละ 1 น้ำหนัก/ปริมาตร เดิมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 5 น้ำหนัก/ปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 นาที

การวิเคราะห์หาปริมาณกรดอินทรีย์ด้วยเครื่อง HPLC พบว่า *K. pneumoniae* LK 39 สามารถผลิตกรดมาลิกในเปลือกข้าวโพดและไซเลนได้สูงสุดเท่ากับ 0.72 และ 0.49 กรัม/ลิตร ที่ชั่วโมงที่ 72 (รูปที่ 4.26 – 4.28) ทั้งนี้อาจเป็นเพราะว่าในเปลือกข้าวโพดมีปริมาณน้ำตาลรีดิวิซ์เริ่มต้นที่ละลายในอาหารมากกว่าในไซเลนจึงทำให้ *K. pneumoniae* LK 39 นำน้ำตาลรีดิวิซ์จากเปลือกข้าวโพดไปใช้ในการเจริญและสร้างสารต่างๆ รวมถึงกรดมาลิกได้มากกว่าน้ำตาลจากไซเลน จากผลการทดลองแบคทีเรียสายพันธุ์ *K. pneumoniae* LK 39 ผลิตกรดมาลิกได้น้อยมากเมื่อเทียบกับน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวคือน้ำตาลไซโลส

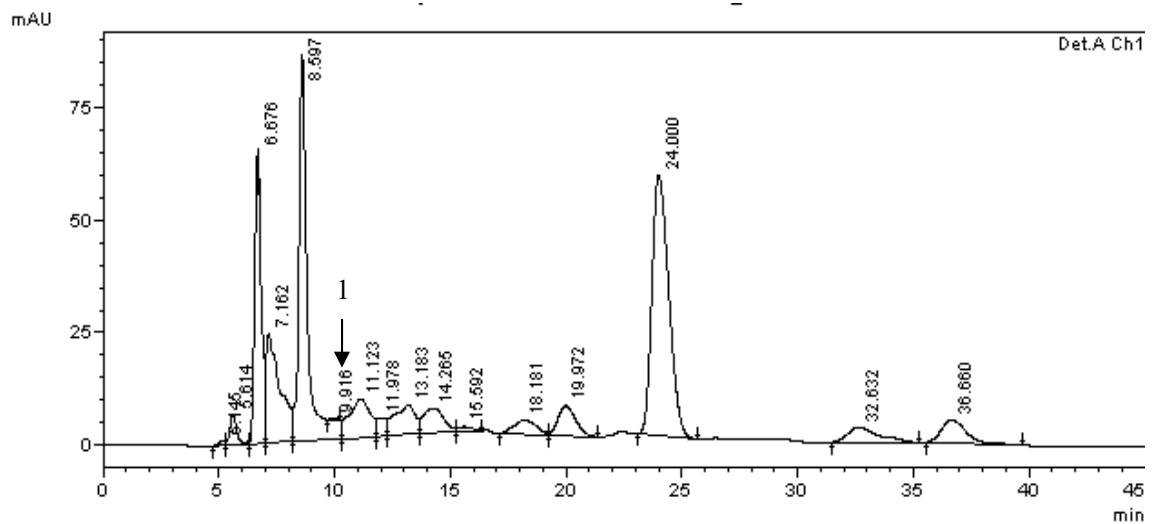
เมื่อตรวจวัดกิจกรรมเอนไซม์ของไซลานเนสซึ่งเป็นเอนไซม์หลักในกลุ่ม xylanolytic enzyme พบว่าไม่สามารถตรวจพบกิจกรรมเอนไซม์ไซลานเนสซึ่งเป็นเอนไซม์หลักในการย่อยไซเลน เพราะ *K. pneumoniae* LK 39 ไม่สามารถสร้างเอนไซม์ไซลานเนสที่สามารถเปลี่ยนโครงสร้างเฮมิเซลลูโลสในเปลือกข้าวโพดและไซเลนเป็นน้ำตาลไซโลสได้ จึงทำให้น้ำตาลไซโลสสำหรับการผลิตกรดมาลิกได้น้อยลง ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมคือน้ำตาลไซโลส แต่สามารถนำเปลือกข้าวโพดหรือไซเลนมาใช้ผลิตกรดมาลิกได้ แต่ต้องมีการเติมเอนไซม์ไซลานเนสเพื่อย่อยเฮมิเซลลูโลสหรือไซเลนเหล่านี้เป็นไซโลสต่อไป



รูปที่ 4.26 การเปลี่ยนแปลงกรดมาลิกในอาหารเหลว Basal ของ *K. pneumoniae* LK 39 ที่มีเปลือกข้าวโพดและไซเลนเข้มข้นร้อยละ 1 น้ำหนัก/ปริมาตร เติมแคลเซียมคาร์บอเนต 5 น้ำหนัก/ปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 250 รอบ/นาที



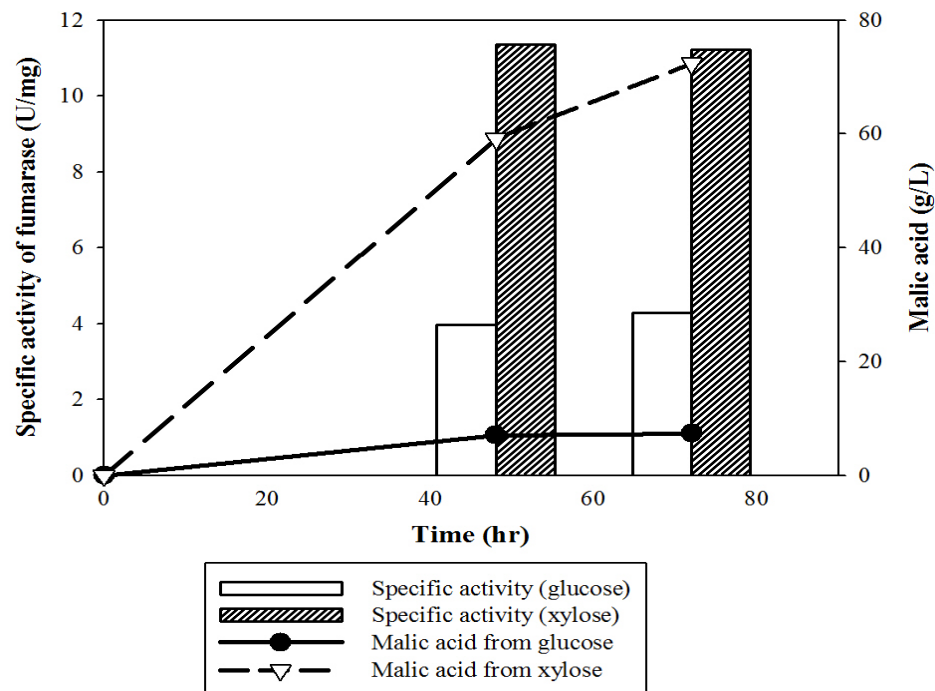
รูปที่ 4.27 โครมาโตแกรมจากเครื่อง HPLC ของ *K. pneumoniae* LK 39 ที่เลี้ยงในอาหารเหลว Basal ที่มีไข่แลรียละ 1 น้ำหนัก/ปริมาตร แคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 5 น้ำหนัก/ปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบ/นาที ที่เวลา 72 ชั่วโมงโดยฟิลาที่ 1. กรดมาลิก



รูปที่ 4.28 โครมาโตแกรมจากเครื่อง HPLC ของ *K. pneumoniae* LK 39 ที่เลี้ยงในอาหารเหลว Basal ที่มีเปลือกข้าวโพดร้อยละ 1 น้ำหนัก/ปริมาตร แคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 5 น้ำหนัก/ปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบ/นาที ที่เวลา 72 ชั่วโมง โดยฟิลาที่ 1 คือกรดมาลิก

4.5 การทดสอบกิจกรรมเอนไซม์ฟิวมาเลสจากเชื้อ *K. pneumoniae* LK 39

ในการศึกษากิจกรรมเอนไซม์ฟิวมาเลสโดยเลี้ยงเชื้อ *K. pneumoniae* LK 39 ในอาหารเหลว Basal และเติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 5 น้ำหนัก/ปริมาตร ใช้น้ำตาลไซโลสหรือกลูโคสที่ความเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร/ปริมาตร เป็นแหล่งคาร์บอน และเก็บตัวอย่างที่ 0, 48 และ 72 ชั่วโมง เนื่องจากเป็นระยะเวลาที่ผลิตกรดมาลิกในปริมาณที่สูง เพื่อตรวจวัดกิจกรรมเอนไซม์ฟิวมาเลสภายในเซลล์ (intracellular) และส่วนใส (culture supernatant) จากผลการทดลองพบว่าสามารถตรวจวัดกิจกรรมเอนไซม์ฟิวมาเลสภายในเซลล์ (intracellular) ได้ในปริมาณที่สูง และไม่สามารถตรวจพบเอนไซม์ฟิวมาเลสในส่วนใส (culture supernatant) ทั้งนี้สรุปได้ว่าเอนไซม์ฟิวมาเลสเป็นเอนไซม์ที่ผลิตขึ้นภายในเซลล์ และนอกจากนี้พบว่าการเลี้ยงเชื้อ *K. pneumoniae* LK 39 โดยใช้น้ำตาลไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอนมีปริมาณกิจกรรมเอนไซม์สูงกว่าการใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน (รูปที่ 4.29) ทั้งนี้ อาจเป็นเพราะว่าน้ำตาลไซโลสเป็นตัวเหนี่ยวนำให้ขึ้นเกิดการแสดงออกของเอนไซม์ฟิวมาเลสได้ดีกว่าน้ำตาลกลูโคส อาจทำให้เชื้อ *K. pneumoniae* LK 39 สามารถเปลี่ยนกรดฟิวมาลิกเป็นกรดมาลิกได้ดีกว่าการเลี้ยงในน้ำตาลกลูโคส จึงทำให้พบปริมาณกรดมาลิกที่ผลิตน้ำตาลไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอนสูงกว่าน้ำตาลกลูโคสเท่ากับ 72.36 กรัม/ลิตร และ 7.35 กรัม/ลิตร (รูปที่ 4.29)

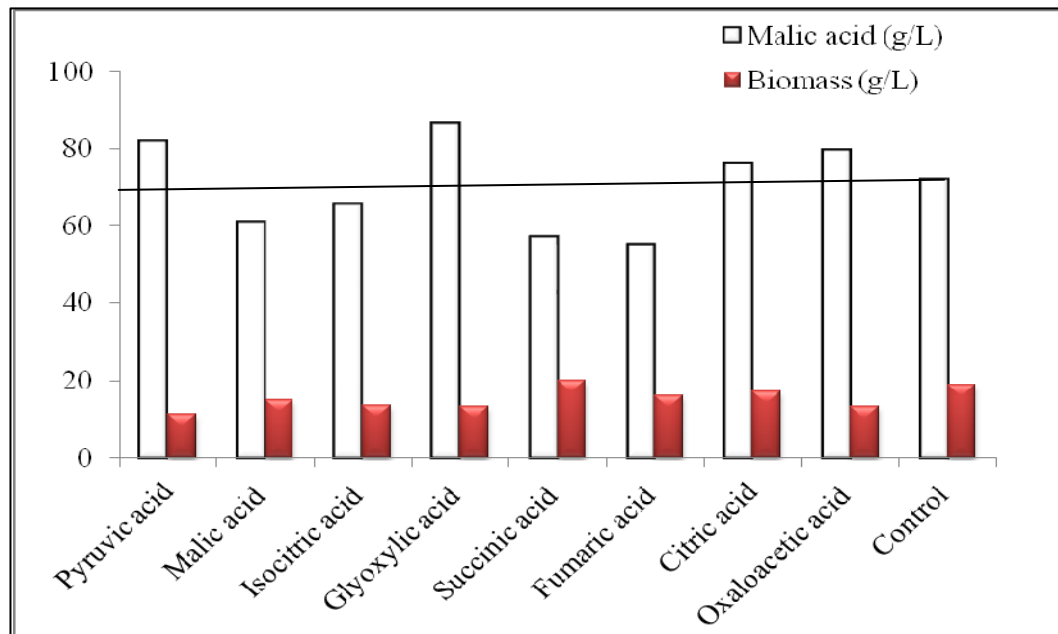


รูปที่ 4.29 ค่า specific activity ของเอนไซม์ fumarase และปริมาณกรดมาลิกจากเชื้อ *K. pneumoniae* LK 39 โดยเลี้ยงในอาหารเหลว Basal ที่มีน้ำตาลไซโลสและกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน

4.6 การศึกษาการเพิ่มปริมาณกรดมาลิกด้วยกรดอินทรีย์

ในการศึกษาการเพิ่มปริมาณกรดมาลิกด้วยตัวเหนี่ยวนำ โดยเตรียมอาหารเหลว Basal เติมน้ำตาลไซโลส 10 ปริมาตร/ปริมาตร เป็นแหล่งคาร์บอน และเติมกรดอินทรีย์เพื่อทำหน้าที่เป็นตัวเหนี่ยวนำการผลิตกรดมาลิกดังนี้ กรดไพรูวิก กรดซิตริก กรดไอโซซิตริก กรดไกลออกซาลิก กรดซักซินิก กรดฟูมาลิก กรดออกซาโลอซิติก และชุดการทดลองที่ไม่เติมกรดอินทรีย์เป็นชุดควบคุม นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบ/นาที เก็บผลการทดลองที่เวลา 72 ชั่วโมง จากการทดลองพบว่าจุลินทรีย์สามารถเจริญได้ในทุกชนิดตัวเหนี่ยวนำ และจุลินทรีย์ที่เจริญได้สูงที่สุดคือเติมกรดซักซินิกเท่ากับ 20.03 ± 0.67 กรัม/ลิตร และจุลินทรีย์ที่เจริญได้น้อยที่สุดคือเติมกรดไพรูวิกเท่ากับ 11.00 ± 1.41 กรัม/ลิตร และนอกจากนี้เมื่อเติมกรดอินทรีย์ในปริมาณร้อยละ 0.5 น้ำหนัก/ปริมาตร พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณกรดมาลิกจากจากที่ไม่เติมกรดอินทรีย์เท่ากับ 71.98 ± 0.99 เป็น 86.36 ± 3.01 , 81.88 ± 0.63 , 79.65 ± 2.14 และ 76.211 ± 1.44 กรัม/ลิตร เมื่อเติมกรดไกลออกซาลิก กรดไพรูวิก กรดไอโซซิตริก และกรดซิตริก ตามลำดับ ดังนั้นสรุปได้ว่าการเติมกรดอินทรีย์ที่อยู่ในวัฏจักรเครบส์อาจไปเหนี่ยวนำการผลิตกรดมาลิก

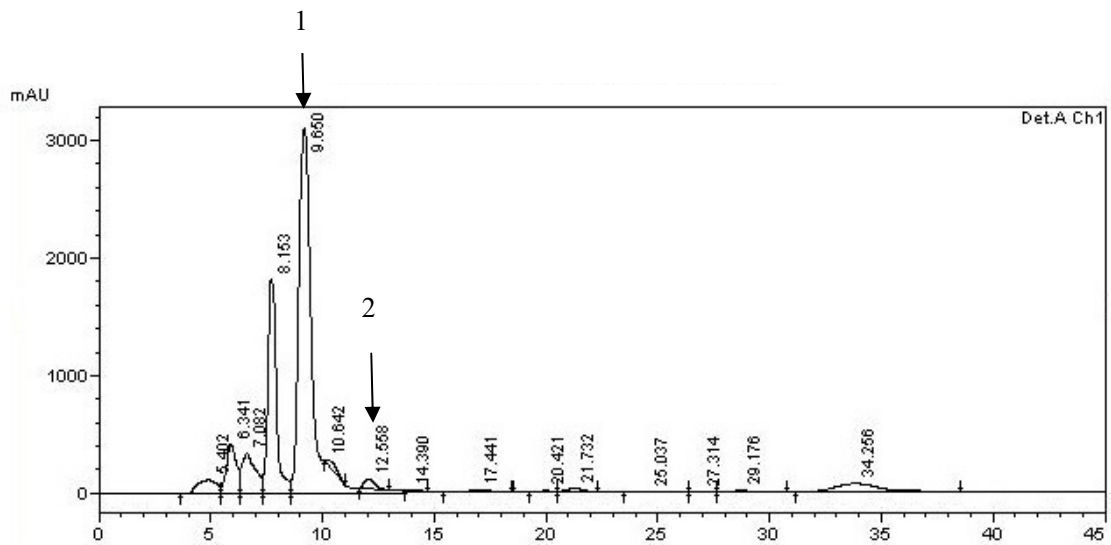
ลิกให้ได้ปริมาณเพิ่มมากขึ้นเมื่อเทียบกับชุดการทดลองควบคุม และจากผลการทดลองยังพบว่า กระบวนการผลิตกรดมาลิกอาจมาจากวัฏจักรเครบส์ (Krebs cycle) หรือวัฏจักรไพรูเวท คาร์บ็อกซิเลชัน – ออกซาลาซิเตรทรีดักชัน (Pyruvate carboxylation – oxaloacetate reduction pathway) และวัฏจักรไกออกซาลิท (Glyoxylate cycle)



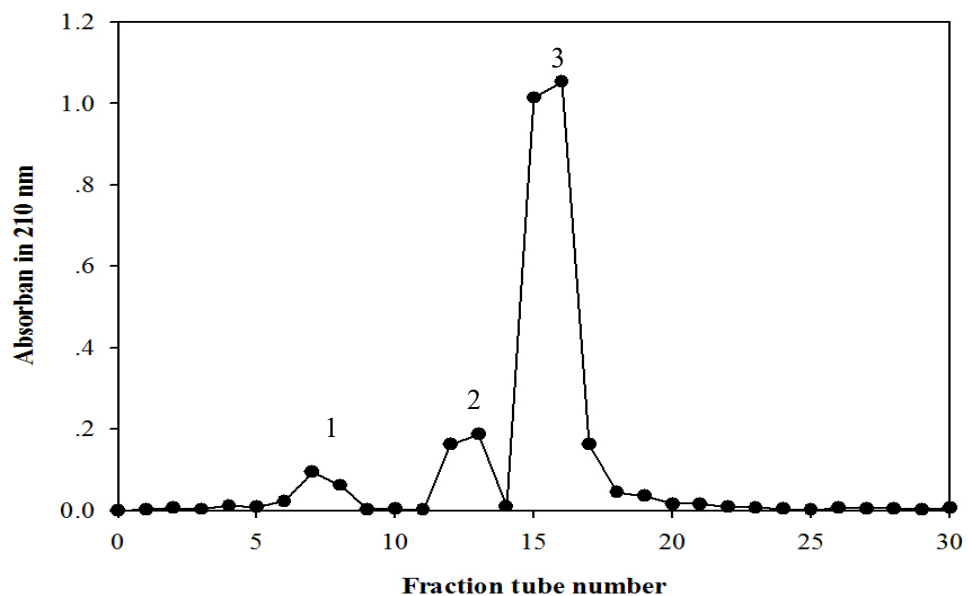
รูปที่ 4.30 ผลของกรดอินทรีย์ที่เติมลงในอาหารเหลว Basal ที่มีน้ำตาลไซโกลเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร/ปริมาตร เป็นแหล่งคาร์บอนของเชื้อ *K. pneumoniae* LK 39 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ความเร็ว 250 รอบ/นาที

4.7 การทำให้กรดอินทรีย์บริสุทธิ์และวิเคราะห์ชนิดของสารตัวอย่างโดยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

ในการศึกษาการทำให้สารบริสุทธิ์และวิเคราะห์ชนิดของสารตัวอย่างด้วยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ต้องมีสารละลายกรดอินทรีย์มาตรฐานเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ว่าสารละลายตัวอย่างเป็นสารชนิดใด โดยสารละลายมาตรฐานที่ใช้ในการทดลองนี้คือ กรดมาลิก กรดซักซินิก กรดอิทาโคนิก กรดฟูมาลิก และกรดอะดีฟิก (ภาคผนวก ก.1) จากนั้นนำน้ำหนักของ *K. pneumoniae* LK 39 ที่มีน้ำตาลไซโลสร้อยละ 10 ปริมาตร/ปริมาตร เป็นแหล่งคาร์บอน ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 5 น้ำหนัก/ปริมาตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบ/นาที นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้คอลัมน์ Aminex® HPX-87H Column (300x7.8 mm) อัตราการไหล 0.6 มิลลิลิตร/นาที อุณหภูมิคอลัมน์ 30 องศาเซลเซียส วัฏภาคเคลื่อนที่คือกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 0.005 โมล และใช้ UV-VISIBLE เป็น detector ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร พบว่ากรดมาลิกซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์หลักจากการหมักมีค่า Retention time เท่ากับ 9.650 ใกล้เคียงกับสารละลายมาตรฐานกรดมาลิกคือ 9.690 ซึ่งคาดว่าน่าจะเป็นกรดมาลิก แต่จากค่า Retention time ต่างกันเล็กน้อย และจากโครมาโตแกรมยังพบพีคอื่นๆเกิดขึ้น (รูปที่ 4.30) ดังนั้นต้องทำให้กรดอินทรีย์ที่ *K. pneumoniae* LK 39 ผลิตขึ้นเป็นสารบริสุทธิ์ด้วยเครื่อง HPLC โดยอัตราการไหลเท่ากับ 0.6 มิลลิลิตร/นาที เก็บ fraction ละ 150 ไมโครลิตร และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร พบว่ามีค่าการดูดกลืนแสงเกิดขึ้น 3 พีค โดยพีคที่ 3 (fraction ที่ 15 – 16) มีค่าการดูดกลืนแสงมากที่สุด (รูปที่ 4.31)

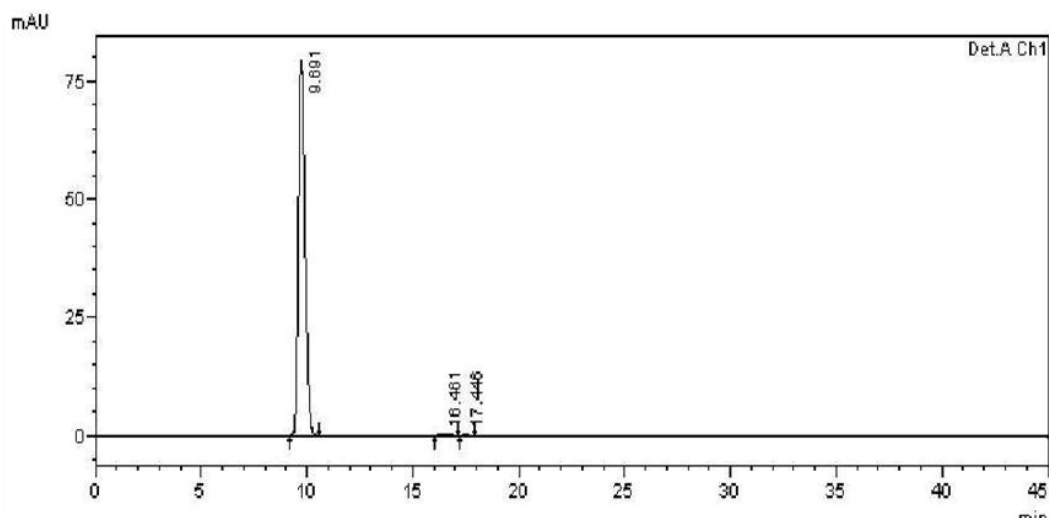


รูปที่ 4.31 โครมาโตแกรมจากเครื่อง HPLC ของ *K. pneumoniae* LK 39 ที่เลี้ยงในอาหารเหลว Basal ที่มีน้ำตาลไซโลสเริ่มต้นร้อยละ 10 ปริมาตร/ปริมาตร เติมน้ำเกลือคาร์บอนเตอร้อยละ 5 น้ำหนัก/ปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่เวลา 72 ชั่วโมง ความเร็ว 250 รอบ/นาที่ โดยพีคที่ 1. คือกรดมาลิก 2. คือกรดซักซินิก

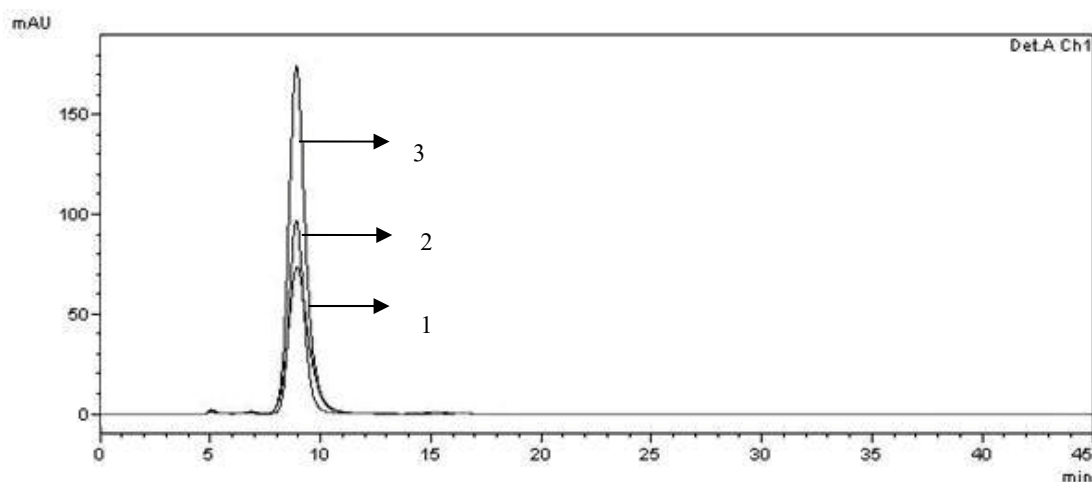


รูปที่ 4.32 กราฟค่าการดูดกลืนแสงของกรดอินทรีย์ที่ผลิตจาก *K. pneumoniae* LK 39 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Basal ที่มีน้ำตาลไซโลสเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร/ปริมาตร เติมน้ำเกลือคาร์บอนเตอร้อยละ 5 น้ำหนัก/ปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 250 รอบ/นาที่

จากกราฟจะเห็นได้ว่า fraction ที่ 15 และ 16 ในพีคที่ 3 มีค่าการดูดกลืนแสงสูงที่สุด ดังนั้นจึงนำ fraction ที่ 15 และ 16 ไปตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยเครื่อง HPLC อีกครั้ง เพื่อความบริสุทธิ์ของแต่ละ fraction ซึ่งความบริสุทธิ์ที่ต้องการคือร้อยละ 99 ซึ่งหมายถึงว่ามีกรดอินทรีย์อื่นๆปนเปื้อนอยู่น้อยมาก พบว่า fraction ที่ 15 มีความบริสุทธิ์ร้อยละ 99 (รูปที่ 4.32) และ fraction ที่ 16 มีความบริสุทธิ์ร้อยละ 97 ซึ่งอาจปนเปื้อนของกรดอินทรีย์บางชนิดจาก fraction 17 จึงนำ fraction ที่ 15 ไปวิเคราะห์ชนิดของกรดอินทรีย์โดยนำกรดอินทรีย์ (กรดมาลิก) ที่ผลิตจาก *K. pneumoniae* LK 39 โดยมีความเข้มข้นร้อยละ 0.008 กรัม/ลิตร ผสมลงในสารละลายกรดอินทรีย์มาตรฐานกรดมาลิกจาก Sigma aldrich ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 0.011 กรัม/ลิตร ด้วยอัตราส่วน 1:1 และนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ผลการทดลองพบว่าพีคของสารละลายมาตรฐานกรดมาลิกที่ผสมลงในสารละลายตัวอย่างเป็นพีคเดียวกัน แสดงว่า *K. pneumoniae* LK 39 ผลิตขึ้นเป็นกรดมาลิกจริง (รูปที่ 4.33)



รูปที่ 4.33 โครมาโตแกรมจากเครื่อง HPLC ของ fraction ที่ 15 มีความบริสุทธิ์ร้อยละ 99 ที่ผลิตจาก *K. pneumoniae* LK 39



รูปที่ 4.34 โครมาโตแกรมจากเครื่อง HPLC โดยที่พีคที่ 1.คือกรดมาลิกของ *K. pneumoniae* LK 39 ที่เลี้ยงในอาหารเหลว Basal ที่มีน้ำตาลไซโลสเริ่มต้นร้อยละ 10 ปริมาตร/ปริมาตร แคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 5 น้ำหนัก/ปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบ/นาทื พีคที่ 2. คือสารละลายมาตรฐานกรดมาลิก 3. คือผสมกรดมาลิกของ *K. pneumoniae* LK 39 และสารละลายมาตรฐานกรดมาลิก (internal standard)

4.8 การวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์อื่นๆ โดยเทคนิค Gas Chromatography (GC)

จากการตรวจสอบผลิตภัณฑ์อื่นๆ นอกจากกรดมาลิกซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์หลัก จากการเพาะเลี้ยงในอาหาร Basal โดยมีน้ำตาลไซโลสเข้มข้นร้อยละ 10 (ปริมาตร/ปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน เดิมเชื้อตั้งต้น (starter) ปริมาตรร้อยละ 5 (ปริมาตร/ปริมาตร) และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 rpm เป็นเวลา 72 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปตรวจวัดผลิตภัณฑ์อื่นๆ ด้วยเครื่อง Gas Chromatography (GC) แสดงดังตารางที่ 4.7

ตารางที่ 4.6 ชนิดและความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ในน้ำหมักของ *K. pneumoniae* LK 39 จากการตรวจวัดด้วยเครื่อง Gas Chromatography (GC) เมื่อป้อนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบ/นาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมัก	ความเข้มข้น (%)
Ethanol	0.167
Acetic acid	0.058
Butyric acid	0.059

จากผลการทดลองพบว่านอกจากผลิตภัณฑ์กรดมาลิกและกรดซัลซินิกแล้ว *K. pneumoniae* LK 39 ผลิตเอทานอล กรดอะซิติก และบิวทริกได้น้อยมาก เนื่องจากสารข้างต้นเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการเจริญแบบไม่ใช้ออกซิเจน (Fermentation pathway) แต่สภาวะที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้เขย่าที่ความเร็ว 250 รอบ/นาที ซึ่งส่งผลให้จุลินทรีย์มีกระบวนการหายใจแบบใช้ออกซิเจน (oxidative pathway) จึงทำให้ตรวจพบเอทานอล กรดอะซิติก และบิวทริกได้น้อยกว่ากรดต่างๆที่อยู่ในกระบวนการหายใจแบบใช้ออกซิเจน (oxidative pathway) เช่น กรดมาลิก