

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

5.1.1 คัดแยกจุลินทรีย์จากตัวอย่างต่างๆในประเทศไทยจำนวน 401 ตัวอย่าง สามารถคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญบนอาหาร yeast extract peptone บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบ/นาทิต เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สามารถคัดแยกแบคทีเรียเดี่ยวได้ทั้งหมด 106 ไอโซเลท

5.1.2 นำแบคทีเรียเดี่ยว 106 ไอโซเลทมาคัดเลือกไอโซเลทที่สามารถผลิตกรดในอาหารเหลว Basal ที่มีน้ำตาลไซโลสร้อยละ 10 ปริมาตร/ปริมาตร เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่ามี 6 ไอโซเลทที่สามารถเจริญและค่าพีเอชในอาหารต่ำกว่าพีเอช 5.0

5.1.3 นำแบคทีเรีย 6 ไอโซเลทมาคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตกรดอินทรีย์บนอาหารแข็งที่มีแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 1 น้ำหนัก/ปริมาตร พบว่า LK 33, LK 34 และ LK 39 สามารถสร้างบริเวณใส (clear zone) ได้สูงมีค่าเท่ากับ 4.00, 3.05 และ 4.33 เซนติเมตร ตามลำดับ และสามารถผลิตกรดมาลิกได้สูงที่สุดคือ 24.163, 30.903 และ 32.425 กรัม/ลิตรตามลำดับ ที่เวลา 48 ชั่วโมง

5.1.4 นำแบคทีเรียไอโซเลท LK 33, LK 34 และ LK 39 มาทดสอบการผลิตกรดมาลิกที่ระยะเวลาต่างๆ ในอาหารเหลว Basal ที่มีแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 1 น้ำหนัก/ปริมาตร โดยมีน้ำตาลไซโลสเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร/ปริมาตร เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าไอโซเลท LK 39 สามารถผลิตกรดมาลิกซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์หลักมีค่าสูงสุดในชั่วโมงที่ 72 มีค่า 60.02 กรัม/ลิตร และค่าผลได้เท่ากับร้อยละ 60 ค่ากำลังการผลิตเท่ากับ 0.83 กรัม/ลิตร/ชั่วโมง ดังนั้นจึงเลือกจุลินทรีย์ไอโซเลท LK 39 ไปพิสูจน์เอกลักษณ์ของจุลินทรีย์และใช้ในการทดลองขั้นตอนต่อไป

5.1.5 แบคทีเรียไอโซเลท LK 39 มีลักษณะโคโลนีเป็นวงกลม ขอบเรียบ สีขาวขุ่น มันวาวบนผิวหน้า สามารถมองเห็นผ่านกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 100X เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างแท่ง เนื่องจากย้อมติดสีแดงของซัลฟานิล

5.1.6 จากการพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ LK 39 ด้วยเทคนิค 16S rRNA พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ LK 39 มีความคล้ายคลึงกับ *Klebsiella pneumonia* sup species ร้อยละ 99 และ *K. pneumoniae* ยังไม่เคยมีรายงานว่าสามารถผลิตกรดมาลิกจากน้ำตาลไซโลสได้เลย ดังนั้นจึงสนใจศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียและสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดมาลิก

5.1.7 จากการศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียและสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดมาลิกแล้วพบว่าสภาวะที่เหมาะสมของ *K. pneumoniae* LK 39 ในการผลิตกรดมาลิกคือน้ำตาลไซโลสร้อยละ 10 ปริมาตร/ปริมาตร เป็นแหล่งคาร์บอน เดิมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 5 น้ำหนัก/ปริมาตร ปริมาณเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 5 ปริมาตร/ปริมาตร โดยปรับปริมาตรเซลล์ให้มีค่า optical density (OD_{600}) ประมาณ 0.5 (38×10^8 CFU/mL) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบ/นาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง สามารถผลิตกรดมาลิกซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์หลักสูงสุดเท่ากับ 72.36 กรัม/ลิตร ค่ากำลังการผลิตเท่ากับ 0.99 กรัม/ลิตร/ชั่วโมง และค่าผลได้เท่ากับร้อยละ 72

5.1.8 *K. pneumoniae* LK 39 สามารถผลิตกรดมาลิกจากน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว คือ น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลแมนโนส น้ำตาลกาแลคโตส น้ำตาลอะราบินอส ตามลำดับโดยใช้ความเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร/ปริมาตร และพอลิเมอร์เชิงซ้อนคือ ไฮแลน และเปลือกข้าวโพดใช้ความเข้มข้น ร้อยละ 1 น้ำหนัก/ปริมาตร ในปริมาณที่ต่ำเมื่อเทียบกับน้ำตาลไซโลสที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอน

5.1.9 การศึกษากิจกรรมเอนไซม์ฟูลมาเลสจาก *K. pneumoniae* LK 39 พบว่าสามารถตรวจวัดกิจกรรมเอนไซม์ฟูลมาเลสภายในเซลล์ (intracellular) ในปริมาณที่สูง และไม่สามารถตรวจพบเอนไซม์ฟูลมาเลสในส่วนใส (culture supernatant) นอกจากนี้พบว่าการเลี้ยงเชื้อ *K. pneumoniae* LK 39 โดยใช้ น้ำตาลไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอนมีปริมาณกิจกรรมเอนไซม์สูงกว่า 2 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน

5.1.10 การศึกษาการเพิ่มปริมาณกรดมาลิกด้วยกรดอินทรีย์พบว่า *K. pneumoniae* LK 39 สามารถเจริญได้ในทุกชนิดกรดอินทรีย์ และสามารถเพิ่มปริมาณกรดมาลิกเท่ากับ 71.98 ± 0.99 เป็น 86.36 ± 3.01 , 81.88 ± 0.63 , 79.65 ± 2.14 และ 76.211 ± 1.44 กรัม/ลิตร เมื่อเติมกรดไคออกซาลิก กรดไพรูวิก กรดไอโซซิทริก และกรดซิตริก ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอน

5.1.11 การศึกษาการทำให้กรดอินทรีย์บริสุทธิ์ด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) โดยใช้อัตราการไหล เท่ากับ 0.6 มิลลิลิตร/นาที โดยเก็บ fraction ละ 150 ไมโครลิตร และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร พบว่า fraction ที่ 15 มีค่าการดูดกลืนแสงมากที่สุดและมีความบริสุทธิ์มากที่สุด

5.1.12 การวิเคราะห์ชนิดของกรดอินทรีย์โดยนำกรดมาลิกจาก fraction ที่ 15 ของ *K. pneumoniae* LK 39 ที่ผลิตผสมในสารละลายกรดมาลิกมาตรฐานและนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ผลการทดลองพบว่าพีคของสารละลายมาตรฐานกรดมาลิกที่ผสมลงในสารละลายตัวอย่างเป็นพีคเดียวกัน จึงทำให้ยืนยันว่าสารที่ *K. pneumoniae* LK 39 ผลิตได้เป็นกรดมาลิก

5.1.13 ภายใต้สภาวะการเจริญแบบมีอากาศ *K. pneumoniae* LK 39 ผลิตกรดมาลิกสูงที่สุด รองลงมาคือกรดซักซินิก รวมถึงผลิตเอทานอล กรดอะซิติก และบิวทริกแต่ผลิตได้ต่ำมากเมื่อเปรียบเทียบกับกรดมาลิก

5.1.14 จากรายงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่า *K. pneumoniae* LK 39 เป็นสายพันธุ์แรกที่สามารถผลิตกรดมาลิกจากน้ำตาลไซโลส และใช้ระยะเวลาสั้นที่สุดในการผลิตคือ 72 ชั่วโมง แต่ได้กรดมาลิกสูงที่สุดคือ 72.36 กรัม/ลิตร (ตารางที่ 5.1)

ตารางที่ 5.1 การเปรียบเทียบการผลิตกรดมาลิกจาก *K. pneumoniae* LK 39 กับจุลินทรีย์สายพันธุ์อื่นๆ

Microorganism	Bioreactor	Product (g/L)	Time (hr)	Productivity (g/l/h)	Yield (g/g sugar)	Reference
<i>Aureobasidium</i> sp. A-91	Shake flask	PMLA 47	168	0.28	0.39	Nagata และ คณะ, 1993
<i>Physarum</i> <i>polycephalum</i>	Shake flask	PMLA 2.7	144	0.02	0.06	Lee และ Holler, 1999
<i>Aureobasidium</i> <i>pullulans</i>	Shake flask	PMLA 62.27	168	0.37	0.77	Zhang และ คณะ, 2011
<i>Aureobasidium</i> sp. P6	Shake flask	PMLA 100.7 g	168	0.59	0.72	Ma และคณะ, 2013
<i>K. pneumoniae</i> LK 39	Shake flask	Malic acid 72.36	72	0.99	0.72	This study

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1. ทำการศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตกรดมาลิกซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์หลักของแบคทีเรียสายพันธุ์ *K. pneumoniae* LK 39 เช่น ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์เริ่มต้น อุณหภูมิ ความเร็วรอบของการเขย่า แหล่งไนโตรเจนเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการเจริญ และการผลิตกรดมาลิก

5.2.2 ทำการศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของกรดอินทรีย์ที่เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อเพิ่มปริมาณกรดมาลิกให้ได้ปริมาณมากที่สุด

5.2.3 ทำการศึกษการปรับสภาพวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร และนำเอนไซม์ทางการค้ามาไฮโดรไลซัลเพื่อเปลี่ยนเฮมิเซลลูโลสเป็นน้ำตาลไซโลส เพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนหลักให้แบคทีเรียสายพันธุ์ *K. pneumoniae* LK 39 ผลิตกรดมาลิก

5.2.4 ทำการศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของกรดอินทรีย์ที่เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อเพิ่มปริมาณกรดมาลิกให้ได้ปริมาณมากที่สุด