

บทที่ 4

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

4.1 แหล่งตัวอย่างที่นำมาคัดแยกจุลินทรีย์

ตัวอย่างที่นำมาทำการคัดแยกจุลินทรีย์เก็บได้จากแหล่งดินและน้ำเสียจากบริเวณชุมชน ร้านอาหาร บริเวณอาคารบ้านเรือนต่างๆ และโรงงานอุตสาหกรรม เช่น โรงงานอุตสาหกรรมน้ำมัน เป็นต้น โดยเลือกบริเวณที่มีคราบไขมันสะสมอยู่ เนื่องจากในไขมันมีกลีเซอรอลเป็นองค์ประกอบย่อย เมื่อมีการชะล้างคราบไขมันที่มาจากกิจกรรมต่างๆ ทำให้เกิดการทับถมในบริเวณดังกล่าวเป็นเวลานาน ซึ่งอาจมีการสะสมของจุลินทรีย์และอาจพบผลพลอยได้ที่เกิดจากหมักกลีเซอรอลโดยจุลินทรีย์เพื่อผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ โดยเฉพาะการผลิต 3-hydroxypropionic acid ดังนั้นจึงได้เลือกเก็บตัวอย่างจากแหล่งดินและน้ำเสียเหล่านี้เพื่อนำมาทำการคัดแยกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตกรด 3-hydroxypropionic acid โดยลักษณะตัวอย่างแหล่งดินและน้ำเสียที่นำมาทำการคัดแยกจุลินทรีย์แสดงดังภาพที่ 4.1



ภาพที่ 4.1 ตัวอย่างแหล่งดินและน้ำเสียที่นำมาคัดแยกจุลินทรีย์

4.2 การคัดแยกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตกรด

เมื่อนำตัวอย่างดินและน้ำเสียจำนวนทั้งหมด 198 ตัวอย่าง มาทำการคัดแยกจุลินทรีย์ด้วยวิธี Spread plate technique ลงบนอาหารแข็งที่มีกลีเซอรอล 20 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน โดยเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง และมีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนต 10 กรัมต่อลิตร (Tabuchi และคณะ, 1981) ลงในอาหารแข็งเพื่อใช้สังเกตจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตกรด หากจุลินทรีย์ชนิดใดสามารถใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนและมีการสร้างกรดออกมาจะพบการเจริญของโคโลนีที่มีโซนใส (clear zone) เกิดขึ้นรอบ ๆ โคโลนี ซึ่งตัวอย่างของจุลินทรีย์ที่สร้างโซนใสแสดงไว้ดังภาพที่ 4.2 จากการทดลองพบว่าสามารถคัดแยกจุลินทรีย์ที่สร้างโซนใสได้เมื่อเจริญในสภาวะที่มีอากาศและสภาวะไม่มีอากาศ แสดงไว้ดังตารางที่ 4.1 และ 4.2 ตามลำดับ



ไอโซเลท ใหม่ 5



ไอโซเลท Y8



ไอโซเลท Y10



ไอโซเลท Y14



ไอโซเลท Y16



ไอโซเลท Y25

ภาพที่ 4.2 ตัวอย่างลักษณะโคโลนีและการเกิดโซนใสของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จากแหล่งต่างๆ

ตารางที่ 4.1 แสดงแหล่งเก็บตัวอย่าง รหัสเชื้อ และลักษณะโคโลนีของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีอากาศ

แหล่งเก็บตัวอย่าง	รหัสเชื้อ	ลักษณะโคโลนี
บริเวณหลังร้านบะหมี่หมูแดงโรงอาหารเก่า คณะวิทยาศาสตร์ (สจล.)	เก่า (8.1.57)	สีขาว กลม เล็ก ผิวมันวาว
	เก่า 2	สีขาว กลม เล็ก ผิวมันวาว
	เก่า 5	สีขาว กลม เล็ก ผิวมันวาว
น้ำค้างท่อบริเวณหน้าห้องเช่าสยาม1 ซอย อุดมสุข 42 แยก 10-4 เขตบางนา กรุงเทพฯ	ใหม่ ก	สีขาว กลม เล็ก ผิวมันวาว
	ใหม่ จ	สีขาว กลม เล็ก ผิวมันวาว
น้ำเสียจากบริษัท ลพบุรีสตาร์ จำกัด	ใหม่ (6.1.57)	สีขาว กลม เล็ก ผิวมันวาว
อำเภอชัยบาดาล จังหวัดลพบุรี	ใหม่ (8.1.57)	สีขาว กลม ใหญ่ ผิวมันวาว
บริเวณร้านข้าวไข่เจียวและลูกชิ้นทอด	ใหม่ 3	สีใส กลม ใหญ่ ผิวมันวาว
โรงอาหารเก่าคณะวิทยาศาสตร์ (สจล.)	ใหม่ 4	สีขาว กลม ใหญ่ ผิวมันวาว
	ใหม่ 5	สีขาว กลม ใหญ่ ผิวมันวาว
น้ำเสียจากบริษัท ทรัพย์ทิพย์ จำกัด	ใหม่ 8	สีขาว กลม เล็ก ผิวมันวาว
อำเภอชัยบาดาล จังหวัดลพบุรี	ใหม่ 10	สีเหลือง กลม เล็ก ผิวมันวาว
	ใหม่ 12	สีขาว กลม เล็ก ผิวมันวาว
น้ำเน่าเสียข้างหอใน (สจล.)	Y8	สีขาว กลม เล็ก ผิวมันวาว
น้ำเสียจากร้านน้ำเต้าหู้	Y10	สีเหลือง กลม เล็ก ผิวมันวาว
อำเภอศรีราชา จังหวัดชลบุรี	Y14	สีเทา กลม ใหญ่ ผิวมันวาว
ท่อน้ำเสียปล่อยทิ้งจากบ้านเรือนบริเวณ	Y16	สีขาว กลม ใหญ่ ผิวมันวาว
ข้างร้านค้าถุงใหญ่ใจดี ซอยอุดมสุข 42	Y21	สีขาว กลม เล็ก ผิวมันวาว
แยก 2 เขตบางนา กรุงเทพฯ	Y24	สีขาว กลม เล็ก ผิวมันวาว
น้ำเสียบริเวณร้านอาหารริมราง ซอยเก๊ก (สจล.)	Y25	สีขาว กลมเล็ก ผิวมันวาว
น้ำเสียจากถังขยะบริเวณข้างร้านอิสร์ตัน	Y26	สีขาว กลม เล็ก ผิวมันวาว
ซอยเก๊ก1 (สจล.)	Y27	สีขาว กลม เล็ก ผิวมันวาว
	Y28	สีขาว กลม เล็ก ผิวมันวาว
	Y29	สีขาว กลม เล็ก ผิวมันวาว
	Y31	สีขาว กลม ใหญ่ ผิวมันวาว
	Y32	สีขาว กลม ใหญ่ ผิวมันวาว
	Y33	สีขาว กลม เล็ก ผิวมันวาว

ตารางที่ 4.1 แสดงแหล่งเก็บตัวอย่าง รหัสเชื้อ และลักษณะโคโลนีของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีอากาศ (ต่อ)

แหล่งเก็บตัวอย่าง	รหัสเชื้อ	ลักษณะโคโลนี
น้ำเสียจากถังขยะบริเวณข้างร้านอิสรัตน ซอยเกก1 (สจล.)	Y34	สีขาว กลม เล็ก ผิวมันวาว
น้ำค้างท่อที่มีเศษผลไม้และใบไม้เน่าบริเวณ ซอยอุดมสุข 42 แยก 10-4	Y35	สีใส กลม ใหญ่ ผิวมันวาว
เขตบางนา กรุงเทพฯ	Y36	สีเหลือง กลม ผิวมันวาว
	Y37	สีเหลือง กลม เล็ก ผิวมันวาว
	Y38	สีใส กลม เล็ก ผิวมันวาว
	Y39	สีเหลือง กลม เล็ก ผิวมันวาว
เศษใบไม้เน่าทับถมบริเวณท่อหน้า	Y43	สีขาว กลม เล็ก ผิวมันวาว
บ้านเรือนในชุมชนเชลียง 1 เขตบางนา กรุงเทพฯ	Y44	สีขาว กลม เล็ก ผิวมันวาว
ลูกยอเน่าบริเวณต้นยอซอยอุดมสุข42	Y46	สีขาว กลม เล็ก ผิวมันวาว
แยก10-4 เขตบางนา กรุงเทพฯ	ใหม่ 2	สีขาว กลม เล็ก ผิวมันวาว

ตารางที่ 4.2 แสดงแหล่งเก็บตัวอย่าง รหัสเชื้อ และลักษณะโคโลนีของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะที่ไม่มีอากาศ

แหล่งเก็บตัวอย่าง	รหัสเชื้อ	ลักษณะโคโลนี
ตะกอนดินจากบริเวณท่อน้ำทิ้งหอพัก ซอย ลาดกระบัง 13/8	B1-1	สีขาว กลม ขอบและผิวหน้าเรียบ
	B1-2	สีขาว กลม ขอบและผิวหน้าเรียบ
	B1-3	สีขาว กลม ขอบและผิวหน้าเรียบ
	B1-4	สีขาว กลม ขอบและผิวหน้าเรียบ
ดินจากบริเวณร้านขายอาหารตามสั่ง ซอย ลาดกระบัง 13/8	B2-1	สีขาว กลม ขอบและผิวหน้าเรียบ
	B2-2	สีขาว กลม ขอบและผิวหน้าเรียบ
น้ำจากถังขยะบริเวณข้างร้านอิสรัตน เกก 1 (สจล.)	P1-1	สีขาว กลม ขอบและผิวหน้าเรียบ
	P1-2	สีขาว กลม ขอบและผิวหน้าเรียบ
ท่อน้ำเสียปล่อยทิ้งจากบ้านเรือนบริเวณข้าง ร้านค้าสูงใหญ่ใจดี ซอยอุดมสุข 42 แยก 2 เขตบางนา กรุงเทพมหานคร	P3-1	สีขาว กลม ขอบและผิวหน้าเรียบ

ตารางที่ 4.2 แสดงแหล่งเก็บตัวอย่าง รหัสเชื้อ และลักษณะโคโลนีของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะที่ไม่มีอากาศ (ต่อ)

แหล่งเก็บตัวอย่าง	รหัสเชื้อ	ลักษณะโคโลนี
ตะกอนดินจากบริเวณท่อน้ำทิ้ง บ้านพักนาย ธนา พรหมใจรักษ์ 633 ซอยจรัญสนิทวงศ์ 75 แยก 12 เขตบางพลัด แขวงบางพลัด กรุงเทพมหานคร	T3	สีขาว กลม ขอบและผิวหน้าเรียบ
ดินจากบริเวณเล้าไก่ บ้านพักนาย ธนา พรหมใจรักษ์ 633 ซอยจรัญสนิทวงศ์ 75 แยก 12 เขตบางพลัด แขวงบางพลัด กรุงเทพมหานคร	T4	สีขาว กลม ขอบและผิวหน้าเรียบ
ตะกอนดินจากบริเวณท่อน้ำทิ้งร้านขาย อาหารซอยพลโยธิน 46 เขตจตุจักร แขวงเสนานิคม กรุงเทพมหานคร	T5	สีขาว กลม ขอบและผิวหน้าเรียบ

จากการคัดแยกจุลินทรีย์จากแหล่งดินและน้ำเสียที่เก็บจากบริเวณที่คาดว่าจะมีการสะสมของไขมันและกลีเซอรอล จำนวน 198 ตัวอย่าง สามารถคัดแยกจุลินทรีย์ที่สามารถใช้กลีเซอรอลและมีการผลิตกรด (สร้างโซนใส) ได้ 37 และ 12 ไอโซเลท เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีอากาศ (ตารางที่ 4.1) และไม่มีอากาศ (ตารางที่ 4.2) ตามลำดับ โดยสามารถคัดแยกจุลินทรีย์ที่เจริญในสภาวะที่มีอากาศ ใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนและสร้างโซนใสได้จำนวนมากกว่าจุลินทรีย์ที่เจริญในสภาวะที่ไม่มีอากาศ และตัวอย่างน้ำเสียจากถังขยะบริเวณข้างร้านอิสรณ์ ซอยเก๊ก 1 (สจล.) สามารถคัดแยกจุลินทรีย์ที่ใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนและสร้างโซนใสได้จำนวนมากที่สุด โดยคัดแยกได้ทั้งหมด 10 ไอโซเลท (8 ไอโซเลท เจริญในสภาวะที่มีอากาศ และ 2 ไอโซเลท เจริญในสภาวะที่ไม่มีอากาศ) ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากบริเวณถังขยะจะมีการทิ้งสิ่งสกปรกทุกประเภท ซึ่งรวมถึงสิ่งสกปรกที่มีไขมันและกลีเซอรอลเป็นองค์ประกอบ เช่น ถู ลูกชิ้นทอด ถูใส่ปาตองโก ถูใส่หมูหรือไก่สด หรือเศษอาหารประเภทผัด ทอดที่รับประทานไม่หมด และมีการทิ้งสะสมกันทุกวันเป็นเวลานาน ดังนั้นจึงอาจมีการสะสมของจุลินทรีย์เป็นจำนวนมากและสามารถพบจุลินทรีย์ที่หมักกลีเซอรอลเพื่อผลิตเป็นกรดต่าง ๆ ได้ นอกจากนี้ยังพบว่าจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ในสภาวะที่

ไม่มีอากาศมีลักษณะของโคโลนีที่เหมือนกันมาก โดยลักษณะของโคโลนีมีสีขาว กลม ขอบและผิวหน้าเรียบ ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากการคัดแยกจุลินทรีย์ผู้ทดลองใช้อาหาร MRS ดัดแปลง ซึ่งแบคทีเรียกลุ่ม *Lactobacillus* sp. มักชอบเจริญในอาหารชนิดนี้ ดังนั้นโอกาสที่จะคัดแยกได้แบคทีเรียกลุ่ม *Lactobacillus* sp. จึงมีสูงมาก และจากรายงานก่อนหน้านี้พบว่าในปัจจุบันมีเฉพาะแบคทีเรียกลุ่ม *Lactobacillus* sp. ที่สามารถหมักกลีเซอรอลไปเป็น 3-hydroxypropionic acid ได้ ดังนั้นในการคัดแยกจุลินทรีย์ที่เจริญในสภาวะที่ไม่มีอากาศครั้งนี้จึงเลือกใช้อาหาร MRS ดัดแปลงและพบว่าแต่ละไอโซเลทที่คัดแยกได้มีลักษณะเหมือนกันมาก ซึ่งต่างจากการคัดแยกจุลินทรีย์ที่เจริญได้ในสภาวะที่มีอากาศพบว่าจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จากแหล่งตัวอย่างต่าง ๆ มีลักษณะของโคโลนีที่แตกต่างกัน โดยส่วนใหญ่มีลักษณะกลม สีขาว มีขนาดเล็กและใหญ่แตกต่างกันออกไป มีผิวหน้าที่มันวาว แต่บางโคโลนีมีลักษณะสีใสได้แก่ ไอโซเลทใหม่ 3, Y35 และ Y38 และบางโคโลนีมีสีเหลือง ได้แก่ ไอโซเลทใหม่ 10, Y10, Y36 และ Y39 จากนั้นจึงได้นำจุลินทรีย์ที่สร้างโซนใสทั้งหมด ไปทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว เพื่อนำไปตรวจสอบการผลิต 3-hydroxypropionic acid ด้วยเครื่อง HPLC ต่อไป

4.3 การตรวจสอบการผลิต 3-hydroxypropionic acid โดยจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้

ทำการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้แต่ละไอโซเลทลงในอาหารเหลวปริมาตร 10 มิลลิลิตร โดยจุลินทรีย์ที่เจริญในสภาวะที่มีอากาศนำมาเพาะเลี้ยงในอาหาร M9 broth และจุลินทรีย์ที่เจริญในสภาวะที่ไม่มีอากาศนำมาเพาะเลี้ยงในอาหาร MRS broth ดัดแปลง ซึ่งทำการเพาะเลี้ยงใน 2 สภาวะ คือ สภาวะนิ่ง และสภาวะเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง แล้วจึงทำการเก็บตัวอย่างน้ำเลี้ยงมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที (Arasu และคณะ, 2011) เพื่อแยกตะกอนเซลล์ จากนั้นกรองส่วนใสอีกครั้งด้วยเมมเบรนที่มีขนาดรูพรุน 0.45 ไมครอน และนำส่วนใสที่ได้มาทำการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณ 3-hydroxypropionic acid ด้วยเครื่อง HPLC โดยปริมาณการผลิต 3-hydroxypropionic acid ของจุลินทรีย์แต่ละไอโซเลทที่คัดแยกได้ แสดงดังตารางที่ 4.3 และ 4.4 เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีอากาศและสภาวะไม่มีอากาศ ตามลำดับ

ตารางที่ 4.3 แสดงปริมาณ 3-hydroxypropionic acid ที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีอากาศ

ลำดับที่	ไอโซเลท	ปริมาณ 3-hydroxypropionic acid (กรัมต่อลิตร)	
		สภาวะนิ่ง	สภาวะเขย่า
1	เก่า (8.1.57)	1.6 ± 0.4	1.5 ± 0.3
2	เก่า 2	0.4 ± 0.1	0.6 ± 0.2
3	เก่า 5	2.3 ± 0.3	1.4 ± 0.6
4	ใหม่ ก	0.0 ± 0.1	0.0 ± 0.1
5	ใหม่ จ	0.0 ± 0.2	0.0 ± 0.1
6	ใหม่ (6.1.57)	1.2 ± 0.7	1.5 ± 0.3
7	ใหม่ (8.1.57)	1.1 ± 0.6	1.9 ± 0.5
8	ใหม่ 3	2.2 ± 0.4	1.5 ± 0.5
9	ใหม่ 4	0.0 ± 0.2	0.0 ± 0.1
10	ใหม่ 5	2.4 ± 0.3	2.2 ± 0.4
11	ใหม่ 8	0.0 ± 0.1	2.2 ± 0.2
12	ใหม่ 10	0.0 ± 0.1	0.0 ± 0.1
13	ใหม่ 12	1.8 ± 0.5	0.0 ± 0.2
14	Y8	0.3 ± 0.2	0.0 ± 0.1
15	Y10	1.1 ± 0.5	1.5 ± 0.7
16	Y14	1.7 ± 0.6	1.6 ± 0.4
17	Y16	1.5 ± 0.7	1.8 ± 0.4
18	Y21	0.0 ± 0.2	0.0 ± 0.1
19	Y24	0.7 ± 0.1	0.7 ± 0.2
20	Y25	1.4 ± 0.7	1.7 ± 0.5
21	Y26	2.9 ± 0.5	3.4 ± 0.4
22	Y27	1.9 ± 0.7	2.2 ± 0.5
23	Y28	1.6 ± 0.6	1.7 ± 0.8
24	Y29	1.4 ± 0.7	1.7 ± 0.5
25	Y31	1.6 ± 0.4	2.2 ± 0.7
26	Y32	1.6 ± 0.6	0.8 ± 0.2
27	Y33	1.8 ± 0.3	3.0 ± 0.3

ตารางที่ 4.3 แสดงปริมาณ 3-hydroxypropionic acid ที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีอากาศ (ต่อ)

ลำดับที่	ไอโซเลท	ปริมาณ 3-hydroxypropionic acid (กรัมต่อลิตร)	
		สภาวะนิ่ง	สภาวะเขย่า
28	Y34	0.0 ± 0.1	1.0 ± 0.2
29	Y35	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.2
30	Y36	0.0 ± 0.1	0.8 ± 0.3
31	Y37	0.0 ± 0.2	0.0 ± 0.1
32	Y38	0.0 ± 0.1	0.0 ± 0.1
33	Y39	0.0 ± 0.2	0.0 ± 0.1
34	Y43	0.0 ± 0.1	0.8 ± 0.2
35	Y44	0.4 ± 0.3	0.3 ± 0.1
36	Y46	0.0 ± 0.1	0.6 ± 0.2
37	ใหม่ 2	0.0 ± 0.2	0.0 ± 0.1

ตารางที่ 4.4 แสดงปริมาณ 3-hydroxypropionic acid ที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะที่ไม่มีอากาศ

ลำดับที่	ไอโซเลท	ปริมาณ 3-hydroxypropionic acid (กรัมต่อลิตร)	
		สภาวะนิ่ง	สภาวะเขย่า
1	B1-1	0.0 ± 0.1	0.0 ± 0.2
2	B1-2	0.0 ± 0.2	0.0 ± 0.2
3	B1-3	0.0 ± 0.1	0.0 ± 0.2
4	B1-4	0.0 ± 0.2	0.0 ± 0.1
5	B2-1	0.0 ± 0.1	0.0 ± 0.2
6	B2-2	0.0 ± 0.2	0.0 ± 0.1
7	P1-1	0.2 ± 0.1	0.0 ± 0.1
8	P1-2	0.0 ± 0.2	0.0 ± 0.1
9	P3-1	0.0 ± 0.1	0.0 ± 0.1

ตารางที่ 4.4 แสดงปริมาณ 3-hydroxypropionic acid ที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะที่ไม่มีอากาศ (ต่อ)

ลำดับที่	ไอโซเลท	ปริมาณ 3-hydroxypropionic acid (กรัมต่อลิตร)	
		สภาวะนิ่ง	สภาวะเขย่า
10	T3	2.5 ± 0.2	2.4 ± 0.4
11	T4	2.1 ± 0.3	2.0 ± 0.2
12	T5	0.0 ± 0.1	0.0 ± 0.2

จากตารางที่ 4.3 จะเห็นว่าจากการคัดแยกจุลินทรีย์ที่มีการสร้างโซนใส (clear zone) เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีอากาศได้ทั้งหมด 37 ไอโซเลท พบจุลินทรีย์ที่สามารถผลิต 3-hydroxypropionic acid จำนวน 28 ไอโซเลท โดยจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ที่คัดแยกได้สามารถผลิต 3-hydroxypropionic acid ได้ทั้งในสภาวะนิ่งและสภาวะเขย่า มีเพียง 5 ไอโซเลทที่ผลิต 3-hydroxypropionic acid ได้เมื่อเจริญในสภาวะเขย่าเท่านั้น ได้แก่ ไอโซเลทใหม่ 8, Y34, Y36, Y43 และ Y46 และมีเพียง 2 ไอโซเลทที่ผลิต 3-hydroxypropionic acid ได้เมื่อเจริญในสภาวะนิ่งเท่านั้น ได้แก่ ไอโซเลทใหม่ 12 และ Y8 อย่างไรก็ตามจากรายงานที่ผ่านมาพบว่าจุลินทรีย์ประเภท wide type สามารถผลิต 3-hydroxypropionic acid ได้สูงสุด 2.8 กรัมต่อลิตร ซึ่งจุลินทรีย์ดังกล่าวคือ *Lactobacillus collinoides* 17 (Garai-Ibabe และคณะ, 2008) และจากการศึกษาครั้งนี้พบจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิต 3-hydroxypropionic acid ได้อย่างน้อย 2.8 กรัมต่อลิตร เพียง 2 ไอโซเลทเท่านั้น ได้แก่ ไอโซเลท Y26 และ Y33 โดยไอโซเลท Y26 ซึ่งคัดแยกได้จากน้ำเสียจากถังขยะบริเวณร้านบะหมี่หมูแดง เกก1 (สจล.) สามารถผลิต 3-hydroxypropionic acid ได้สูงกว่า 2.8 กรัมต่อลิตร ทั้งในสภาวะนิ่งและสภาวะเขย่า โดยผลิตได้สูงสุด 3.4 ± 0.4 กรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะเขย่า นอกจากนี้ไอโซเลท Y26 ยังสามารถผลิต 3-hydroxypropionic acid ได้สูงกว่าที่มีรายงานในปัจจุบัน (ตารางที่ 4.5) ดังนั้นจึงคัดเลือกไอโซเลท Y26 เพื่อนำไปทำการศึกษาต่อไป

จากตารางที่ 4.4 จะเห็นว่าจากการคัดแยกจุลินทรีย์ที่มีการสร้างโซนใส (clear zone) เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะที่ไม่มีอากาศได้ทั้งหมด 12 ไอโซเลท พบเพียง 3 ไอโซเลทที่มีความสามารถในการผลิต 3-hydroxypropionic acid ได้แก่ 1. ไอโซเลท P1-1 ผลิตได้ 0.2 ± 0.1 กรัมต่อลิตรในสภาวะนิ่ง แต่ไม่มีการผลิต 3-hydroxypropionic acid ในสภาวะเขย่า 2. ไอโซเลท T3 ผลิต 3-hydroxypropionic acid ได้ 2.5 ± 0.2 และ 2.4 ± 0.4 กรัมต่อลิตร ในสภาวะนิ่งและสภาวะเขย่า ตามลำดับ และ 3. ไอโซเลท T4

ผลิต 3-hydroxypropionic acid ได้ 2.1 ± 0.3 และ 2.0 ± 0.2 กรัมต่อลิตร ในสภาวะนิ่งและสภาวะเขย่า ตามลำดับ จากผลที่ได้พบว่าไอโซเลท T3 มีความสามารถในการผลิต 3-hydroxypropionic acid ได้สูงที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะที่ไม่มีอากาศทั้งในสภาวะนิ่ง และสภาวะเขย่า แต่เนื่องจากปริมาณของ 3-hydroxypropionic acid ที่ไอโซเลท T3 ผลิตได้นั้นยังต่ำกว่า 2.8 กรัมต่อลิตร ซึ่งต่ำกว่าเป้าหมายในการศึกษาครั้งนี้ที่ได้ตั้งไว้ ดังนั้นจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้และมีการผลิต 3-hydroxypropionic acid เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะที่ไม่มีอากาศจึงไม่ถูกคัดเลือกเพื่อนำไปทำการศึกษาต่อไป

ตารางที่ 4.5 แสดงปริมาณการผลิต 3-hydroxypropionic acid โดยจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ

Microorganism	Carbon source	Aeration condition	Condition	Productivity (g/L)	Reference
<i>Lactobacillus reuteri</i>	glycerol	CO ₂ fixation 5% CO ₂ and avoid aeration	static	0.3 g/L	Garai-Ibabe และคณะ (2008)
<i>K. pneumonia</i>	glycerol	aerobic conditions	shaking	2.0 g/L	Luo และคณะ (2012)
<i>Lactobacillus</i> sp.	glycerol	CO ₂ fixation 5% CO ₂ and avoid aeration	static	0.1 g/L	Luo และคณะ (2011)
<i>L. collinoides</i> 17	glycerol	CO ₂ fixation 5% CO ₂ and avoid aeration	static	2.8 g/L	Garai-Ibabe และคณะ (2008)
<i>Byssoschlamys</i> sp.	acrylic acid	-	-	4.8% v/v	Takamizawa และคณะ (1993)
<i>Chloroflexus aurantiacus</i>	Propionate	CO ₂ fixation and acetate assimilation	prototroph autotroph	1.3×10^{-4} g/L	Holo (1989)

4.4 การศึกษาลักษณะพื้นฐานทั่วไปของไอโซเลท Y26

ศึกษาลักษณะทางสัณฐานทั่วไปของไอโซเลท Y26 โดยตรวจสอบลักษณะของโคโลนี ได้แก่ สี รูปร่าง ความหนา และขอบของโคโลนี นอกจากนี้ยังตรวจสอบลักษณะพื้นฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์

ด้วยการย้อมแกรมเพื่อดูรูปร่าง การจัดเรียงตัว การสร้างสปอร์ และวัดขนาดของจุลินทรีย์ แสดงผลดังภาพที่ 4.3



ภาพที่ 4.3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาทั่วไปของไอโซเลท Y26 ตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์
ที่กำลังขยาย 1000 เท่า

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาทั่วไปของไอโซเลท Y26 พบว่ามีลักษณะโคโลนีสีขาว กลม เล็ก ขอบเรียบ ผิวหน้ามันวาว มีเมือกเหนียว การย้อมแกรมติดสีแดงของ Safanin จึงจัดเป็นจุลินทรีย์แกรมลบ เซลล์มีรูปร่างเป็นท่อนสั้น และมีการจัดเรียงตัวอยู่กันเป็นคู่ ขนาดเซลล์เท่ากับ 1.5 ไมครอน และไม่มีการสร้างสปอร์

4.5 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของไอโซเลท Y26

จำแนกสายพันธุ์ของไอโซเลท Y26 ได้โดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับ 16S rRNA gene ที่ได้จากการสกัดดีเอ็นเอของแบคทีเรีย โดย 16 rRNA จะถูกเพิ่มจำนวนด้วยวิธี Polymerase chain reaction (PCR) ด้วยเครื่อง DNA thermal cycle โดยใช้ 8F (5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) และ 1492R (5'ACGGCTACCTTGTTACGACTT) เป็น primers สำหรับโคลนยีน 16S rRNA โดยจะโคลนเข้าสู่เวกเตอร์ pGEM T-easy และ Transform เข้าสู่ *Escherichia coli* DH5 α จากนั้นสกัดพลาสมิด ส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ผลดังภาพที่ 4.4 และเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rRNA ของแบคทีเรียชนิดอื่น โดยใช้ฐานข้อมูลจาก National Center of Biotechnology Information databases (NCBI databases) ด้วยโปรแกรม BLAST พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Klebsiella pneumonia* ร้อยละ 99

```

1 AGAGTTTGAT CCTGGCTCAG ATTGAACGCT GCGGGCAGGC CTAACACATG CAAGTCGAGC
61 GGTAGCACAG AGAGCTTGCT CTCGGGTGAC GAGCGGCGGA CGGGTGAGTA ATGTCTGGGA
121 AACTGCCTGA TGGAGGGGGA TAACTACTGG AAACGGTAGC TAATACCGCA TAATGTCGCA
181 AGACCAAAGT GGGGGACCTT CGGGCCCAT GGCATCAGAT GTGCCAGAT GGGATTAGCT
241 AGTAGGTGGG GTAACGGCTC ACCTAGGCGA CGATCCCTAG CTGGTCTGAG AGGATGACCA
301 GCCACACTGG AACTGAGACA CGGTCCAGAC TCCTACGGGA GGCAGCAGTG GGAATATTG
361 CACAATGGGC GCAAGCCTGA TGCAGCCATG CCGCGTGTGT GAAGAAGGCC TTCGGGTTGT
421 AAAGCACTTT CAGCGGGGAG GAAGGCGGTG AGGTAAATAA CCTCATCGAT TGACGTTACC
481 CGCAGAGGAA GCACCGGCTA ACTCCGTGCC AGCAGCCGCG GTAATACGGA GGGTGCAAGC
541 GTTAATCGGA ATTACTGGGC GTAAAGCGCA CGCAGGCGGT CTGTCAAGTC GGATGTGAAA
601 TCCCCGGGCT CAACCTGGGA ACTGCATTGC AAACCTGGCAG GCTAGAGTCT TGTAGAGGGG
661 GGTAGAATTC CAGGTGTAGC GGTGAAATGC GTAGAGATCT GGAGGAATAC CCGTGCGCAA
721 GCGGGCCCCC TGGACAAAGA CTGACGCTCA GGTGCGAAAG CGTGGGGAGC AAACAGGATT
781 AGATACCTTG GTAGTCCACG CCGTAAACGA TGTCGATTGT GAGGTTGTGC CCTTGAGGCG
841 TGGCTTCCGG AGCTAACGCG TTAAATCGAC CGCCTGGGGA GTACGGCCGC AAGGTTAAAA
901 CTCAAATGAA TTGACGGGGG CCCGCACAAG CCGTGAGGCA TGTGGTTTAA TTCGATGCAA
961 CGCGAAGAAC CTTACCTGGT CTTGACATCC ACAGAACTTT CCAGAGATGG ATTGGTGCCT
1021 TCGGGAACCTG TGAGACAGGT GCTGCATGGC TGTCGTCAGC TCGTGTTGTG AAATGTTGGG
1081 TTAAGTCCCG CAACGAGCGC AACCCCTTATC CTTTGTGGCC AGCGGTTAGG CCGGGAATC
1141 AAAGGAGACT GCCAGTGATA AACTGGAGGA AGGTGGGGAT GACGTCAAGT CATCATGGCC
1201 CTTACGACCA GGGCTACACA CGTGCTACAA TGGCATATAC AAAGAGAAGC GACCTCGCGA
1261 GAGCAAGCGG ACCTCATAAA GTATGTCTGA GTCCGGATTG GAGTCTGCAA CTCGACTCCA
1321 TGAAGTCGGA ATCGCTAGTA ATCGTAGATC AGAATGTAC GGTGAATACG TTCCCGGGCC
1381 TTGTACACAC CGCCCGTCAC ACCATGGGAG TGGGTTGCAA AAGAAGTAGG TAGCTTAACC
1441 TTCGGGAGGG CGCTTACCAC TTTGTGATTG ATGACTGGGG TGAAGTCGTA ACAAGGTAAC
1501 C

```

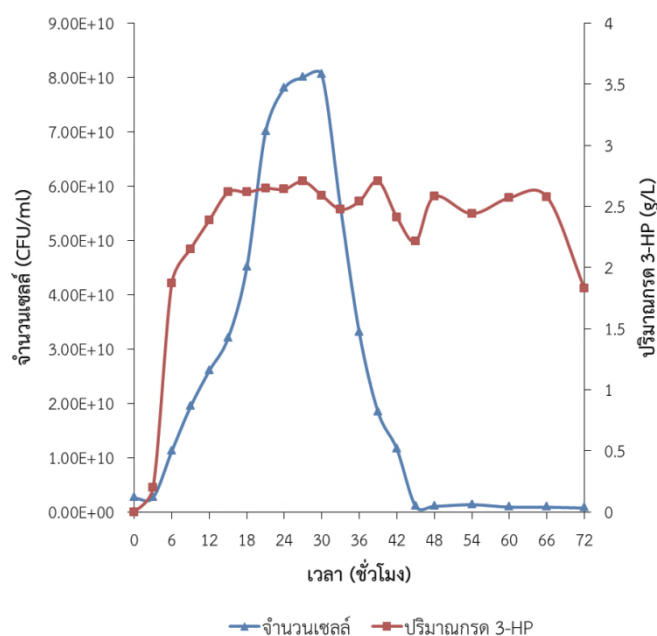
ภาพที่ 4.4 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S ribosomal RNA gene ของไอโซเลท Y26

โดย *K. pneumoniae* จัดเป็นแบคทีเรียแกรมลบ มีรูปร่างเป็นท่อนและมีแคปซูล ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ สามารถเจริญได้ทั้งแบบใช้และไม่ใช้อากาศ (Facultative anaerobic bacterium) จัดอยู่ใน family *Enterobacteriaceae* พบได้ทั่วไปในดิน และเป็น normal flora ที่อาศัยอยู่ในปาก ผิวหนัง และลำไส้ของมนุษย์และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม มีทั้งสายพันธุ์ที่สามารถก่อโรคและไม่ก่อโรค (Arasu และคณะ, 2011) อย่างไรก็ตามแบคทีเรียชนิดนี้ได้ถูกจัดอยู่ในความปลอดภัยทางชีวภาพระดับ 2 (Biosafety Level 2, BSL2) ซึ่งอยู่ในกลุ่มเดียวกับ *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum*, *Staphylococcus aureus* และแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ซึ่งสามารถนำมาใช้ในงานวิจัยได้หากใช้การปฏิบัติตาม BSL 1 ร่วมกับการควบคุมการเข้าออกห้องปฏิบัติการ โดยบุคลากรต้องใช้อุปกรณ์ความปลอดภัย เช่น ตู้ปลอดเชื้อ Class II (อากาศก่อนเข้าตู้จะกรองผ่าน HEPA filter แล้วลงสู่พื้นที่ปฏิบัติงานก่อนปล่อยออกนอกตู้) และหมอนึ่งฆ่าเชื้อ เป็นต้น (คันสนีย์ ชีระพันธ์, 2555) นอกจากนี้จากรายงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่า *K. pneumoniae* หลายสายพันธุ์ซึ่งรวมทั้งสายพันธุ์ที่ก่อโรคได้ถูกนำมาศึกษาเกี่ยวกับการผลิต 3-hydroxypropionic acid และสาร 1,3 propanediol ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ ได้มากมาย เช่น อุตสาหกรรมยา อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง อุตสาหกรรมพอลิเมอร์ และอื่นๆ เป็นต้น (Biebl และคณะ, 1999 ; Zeng และ Biebl, 2002) ดังนั้นจึงมั่นใจได้ว่าจะสามารถที่จะทำงานวิจัยเกี่ยวกับ *K. pneumoniae* ได้ นอกจากนี้จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า *K. pneumoniae* สามารถผลิตวิตามิน B12

และถูกใช้เป็นโคเอนไซม์สำหรับ glycerol dehydratase (dhaB) ซึ่งเอนไซม์ดังกล่าวเป็นเอนไซม์ที่สำคัญในการเปลี่ยนกลีเซอรอลไปเป็น 3-hydroxypropionic acid โดยผ่านวิธีต่าง ๆ (Kumar และคณะ, 2013) ซึ่งหากใช้จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตวิตามิน B12 ได้เอง จะเป็นการลดต้นทุนการผลิตได้เป็นอย่างมาก ดังนั้นจึงเลือกแบคทีเรียที่คัดแยกได้คือ *K. pneumonia* Y26 ไปทำการศึกษาต่อไป

4.6 การศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิต 3-hydroxypropionic acid ของ *Klebsiella pneumonia* Y26

ศึกษาการเจริญเติบโตของ *K. pneumonia* Y26 โดยใช้ความขุ่นของเซลล์เริ่มต้นที่ OD_{600nm} เท่ากับ 0.8 จากนั้นทำการเพาะเลี้ยงที่สภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง วัดการเจริญเติบโตของเซลล์ทุกๆ 3 ชั่วโมง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นวัดการเจริญเติบโตทุกๆ 6 ชั่วโมง จนครบ 72 ชั่วโมง โดยใช้วิธี Spread plate technique เพื่อหาปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตและรายงานผลในหน่วย CFU/ml และตรวจสอบปริมาณของ 3-hydroxypropionic acid ที่ผลิตในเวลาต่างๆ ด้วยเครื่อง HPLC แสดงผลดังภาพที่ 4.5



ภาพที่ 4.5 ลักษณะการเจริญเติบโตและปริมาณ 3-hydroxypropionic acid (กรด 3-HP) ของ *Klebsiella pneumonia* Y26 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร M9 broth ที่เติมกลีเซอรอล 20 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

จากภาพที่ 4.5 พบว่าการเจริญของ *Klebsiella pneumonia* Y26 ระยะ lag phase อยู่ในช่วง 0 - 3 ชั่วโมง log phase อยู่ในช่วง 3 - 24 ชั่วโมง มีระยะ stationary phase ที่ค่อนข้างสั้น และเข้าสู่ระยะ death phase ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 30 สำหรับการตรวจวัดปริมาณ 3-hydroxypropionic acid พบว่าการผลิต 3-hydroxypropionic acid พร้อมกับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ โดยมีการผลิต 3-hydroxypropionic acid ได้สูงสุดในช่วง stationary phase เท่ากับ 2.7 ± 0.3 กรัมต่อลิตร และแนวโน้มของปริมาณ 3-hydroxypropionic acid ค่อนข้างคงที่ภายหลังจากการเจริญในช่วง stationary phase ผ่านไปแล้ว ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากจุลินทรีย์เจริญเข้าสู่ช่วง death phase แล้ว จึงไม่มีการผลิต 3-hydroxypropionic acid ออกมาเพิ่มเติมนั่นเอง นอกจากนี้ยังพบว่าหลังจากชั่วโมงที่ 66 เป็นต้นไปปริมาณของ 3-hydroxypropionic acid มีแนวโน้มลดลง ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากเมื่อจุลินทรีย์เจริญเข้าสู่ช่วง death phase แล้วอาจมีการแตกของเซลล์เกิดขึ้น ทำให้มีเอนไซม์หรือสารเมตาบอไลต์ต่าง ๆ ที่อาจสามารถเปลี่ยน 3-hydroxypropionic acid ไปเป็นสารชนิดอื่นจึงทำให้ปริมาณของ 3-hydroxypropionic acid ที่ตรวจพบมีค่าลดน้อยลง ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงเลือกทำการเพาะเลี้ยง *K. pneumonia* Y26 ที่เวลาเพียง 60 ชั่วโมงเท่านั้น

4.7 การศึกษาผลของความเข้มข้นของกลีเซอรอลต่อการผลิต 3-hydroxypropionic acid

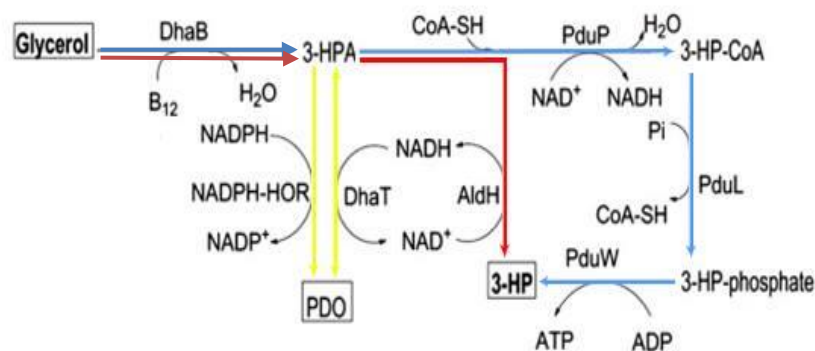
หาก *Klebsiella pneumonia* Y26 สามารถเจริญเติบโตได้ดี และมีการผลิต 3-hydroxypropionic acid ได้สูงเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีกลีเซอรอลเริ่มต้นที่ความเข้มข้นสูง ๆ ย่อมเป็นข้อได้เปรียบของแบคทีเรีย เนื่องจากไม่จำเป็นต้องควบคุมหรือต้องเติมกลีเซอรอลลงไปในการเพาะเลี้ยงระหว่างที่ทำการหมัก ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงได้ศึกษาผลของความเข้มข้นของกลีเซอรอลต่อการผลิต 3-hydroxypropionic acid โดยเพาะเลี้ยง *K. pneumonia* Y26 ที่ควบคุมปริมาณเชื้อเริ่มต้นให้เท่ากันที่ค่าความขุ่น (OD) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.8 ใน M9 broth ที่มีกลีเซอรอล 20, 40, 60, 80 และ 100 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน โดยทำการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ใน 2 สภาวะ คือ สภาวะนิ่ง และ สภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 60 ชั่วโมง จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างน้ำเลี้ยงไปตรวจสอบการผลิต 3-hydroxypropionic acid ด้วยเครื่อง HPLC ผลที่ได้แสดงดังในตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 แสดงปริมาณการผลิต 3-hydroxypropionic acid (กรัมต่อลิตร) โดย *Klebsiella pneumonia* Y26 ที่สภาวะการเพาะเลี้ยงและความเข้มข้นของกลีเซอรอลแตกต่างกัน

ความเข้มข้นของ กลีเซอรอล (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณการผลิต 3-hydroxypropionic acid (กรัมต่อลิตร)	
	สภาวะนิ่ง	สภาวะเขย่า
20	2.5 ± 0.6	3.1 ± 0.4
40	3.2 ± 0.9	4.8 ± 0.7
60	4.1 ± 1.0	6.2 ± 0.6
80	4.5 ± 0.7	7.9 ± 1.0
100	3.8 ± 0.8	5.3 ± 0.7

DhaB
จากตารางที่ 4.6 พบว่า *K. pneumonia* Y26 มีแนวโน้มในการผลิต 3-hydroxypropionic acid ได้สูงขึ้นเมื่อใช้กลีเซอรอลที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นเพิ่มขึ้น โดยสามารถผลิต 3-hydroxypropionic acid ได้สูงสุด เมื่อใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนเริ่มต้นที่ความเข้มข้น 80 กรัมต่อลิตร ทั้งที่เจริญในสภาวะนิ่งและสภาวะเขย่า โดยผลิตได้ 4.5 ± 0.7 และ 7.9 ± 1.0 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยการเพาะเลี้ยงในสภาวะเขย่าสามารถผลิต 3-hydroxypropionic acid ได้สูงกว่าการเพาะเลี้ยงในสภาวะนิ่งคิดเป็นร้อยละ 176 ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Huang และคณะ (2013) ที่รายงานว่าเมื่อทำการเพาะเลี้ยง *K. pneumonia*/pUC18kan-aldHec ในสภาวะที่มีอากาศจะทำให้การผลิต 3-hydroxypropionic acid สูงกว่าการเพาะเลี้ยงในสภาวะที่ไม่มีอากาศ และการเพิ่มอัตราการให้อากาศมีผลทำให้เซลล์เจริญเติบโตได้ดีขึ้นและมีการผลิต 3-hydroxypropionic acid ได้สูงขึ้น ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากการผลิต 3-hydroxypropionic acid โดยใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนโดยจุลินทรีย์ธรรมชาติมักใช้วิถี CoA-dependent (ดังภาพ 4.6; Glycerol $\xrightarrow{\text{DhaB}}$ 3-HPA $\xrightarrow{\text{PduP}}$ 3-HP-CoA $\xrightarrow{\text{PduL}}$ 3-HP-phosphate $\xrightarrow{\text{PduW}}$ 3-hydroxypropionic acid) ซึ่งอาศัยการแสดงออกของกลุ่มยีนที่เรียกว่า propanediol utilization (*pdu*) โดยเป็นกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของเอนไซม์ในการย่อยสลายกลีเซอรอลเริ่มจากกลีเซอรอลจะถูกเปลี่ยนไปเป็น 3-hydroxypropionaldehyde (3-HPA) ด้วยเอนไซม์ glycerol dehydratase (dhaB) ที่มีวิตามิน B12 เป็นโคเอนไซม์ หลังจากนั้น 3-hydroxypropionaldehyde (3-HPA) จะถูกเปลี่ยนต่อไปเป็น 3-HP-phosphate และ 3-hydroxypropionic acid ด้วยเอนไซม์ เช่น propanoldehydrogenase CoA-dependent propionaldehyde dehydrogenase (PduP) phosphotransacylase (PduL) และ propionate kinase (PduW) (Leal และคณะ, 2003; Liu และ

คณะ, 2007; Xue และคณะ, 2008) จากภาพ 4.6 จะพบว่าวิถี CoA-dependent (เส้นสีฟ้า) มีเอนไซม์ที่สำคัญในวิถีอยู่ 2 ชนิดคือ coenzyme A (CoA)-dependent propionaldehyde dehydrogenase (PduP) และ propionate kinase (PduW) ซึ่งต้องการ NAD^+ และ ADP เป็นโคเอนไซม์ ตามลำดับ โดยทั้ง NAD^+ และ ADP จะถูก regenerated ได้ปริมาณสูงเมื่อเซลล์อยู่ในสภาวะ oxidative metabolism หรืออยู่ในสภาวะเขย่าซึ่งมีออกซิเจนสูงนั่นเอง โดยขั้นตอนการเกิดปฏิกิริยาต่างๆในวิถี CoA-dependent (เส้นสีฟ้า) แสดงดังต่อไปนี้



ภาพที่ 4.6 เมตาบอลิซึมของกลีเซอรอลเพื่อเปลี่ยนไปเป็น 3-hydroxypropionic acid

ที่มา: ดัดแปลงจาก Kumar และคณะ, 2013