รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ ผลของเรซินและไดเมทธิลซัลฟอคไซด์ต่อการผลิตวานิลลิน โดยการไบโอทรานส์ฟอร์เมชันของจุลินทรีย์

(Effect of adsorbent resin and dimethyl sulfoxide on vanillin production by microbial biotransformaion)

โดย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อรสร สารพันโชติวิทยา และคณะ

ธันวาคม 2554

สัญญาเลขที่ R2553B033

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ ผลของเรซินและไดเมทธิลซัลฟอคไซด์ต่อการผลิตวานิลลิน โดยการไบโอทรานส์ฟอร์เมชันของจุลินทรีย์

(Effect of adsorbent resin and dimethyl sulfoxide on vanillin production by microbial biotransformaion)

คณะผู้วิจัย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อรสร สารพันโชติวิทยา

ภาควิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

รองศาสตราจารย์ ดร. พัฒนา ศรีพลากิจ

ภาควิชาเภสัชเคมีและเภสัชเวท คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

สนับสนุนโดยกองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยนเรศวร

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาวิจัยเรื่อง “ผลของเรซินและไดเมทธิลซัลฟอคไซด์ต่อการผลิตวานิลลินโดยการไบโอทรานส์ฟอร์เมชันของจุลินทรีย์ (Effect of adsorbent resin and dimethyl sulfoxide on vanillin production by microbial biotransformaion)” ได้รับการสนับสนุนจากกองทุนวิจัย มหาวิทยาลัยนเรศวร (งบประมาณแผ่นดิน ประจำปี 2553) จึงทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จได้ด้วยดี ขอขอบคุณคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่และเครื่องมือวิทยาศาสตร์ในการทดลอง ขอขอบคุณคุณจรรยา รื่นเกษร ผู้ช่วยวิจัยประจำโครงการ นสภ. ณัฐนาเอก นสภ.สุภา ของเข้า และ นสภ. เยาวเรศ เมฆขยาย นิสิตเภสัชศาสตร์ ผู้เป็นส่วนหนึ่งในการช่วยสืบค้นข้อมูลและทำการทดลองเบื้องต้นอย่างตั้งใจและอุตสาหะ ภายใต้โครงการวิจัยในรายวิชาโครงงานทางเภสัชศาสตร์

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณบิดามารดาผู้เป็นกำลังใจ ตลอดจนครูอาจารย์ เจ้าของงานวิจัยที่ผู้วิจัยได้อ้างอิงและมิได้อ้างอิงไว้ในรายงานฉบับนี้ ผู้วิจัยขอขอบคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อรสร สารพันโชติวิทยา

บทคัดย่อ

ชื่อโครงการ	ผลของเรซินและไดเมทธิลซัลฟอคไซด์ต่อการผลิตวานิลลินโดยการไบโอทรานส์ฟอร์เมชันของจุลินทรีย์
ชื่อผู้วิจัย	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อรสร สารพันโชติวิทยา[1] รองศาสตราจารย์ ดร. พัฒนา ศรีพลากิจ[2]
หน่วยงานที่สังกัด	[1]ภาควิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร [2]ภาควิชาเภสัชเคมีและเภสัชเวท คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
หมายเลขโทรศัพท์	0-5596-1872
ได้รับทุนอุดหนุน	กองทุนวิจัย มหาวิทยาลัยนเรศวร (งบประมาณแผ่นดิน ประจำปี 2553)
จำนวนเงิน	สามแสนบาทถ้วน
ระยะเวลาทำการวิจัย	2 ปี

วานิลลิน (4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde) เป็นสารแต่งกลิ่นที่มีความสำคัญมากที่สุดชนิดหนึ่งและมีการใช้อย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมอาหาร งานวิจัยนี้ศึกษาสภาวะการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมในการผลิตวานิลลินจากไอโซยูจินอลโดย *Bacillus sphaericus* ATCC 13805 และ *Streptomyces peucetius* var. caesius TISTR 3355 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 50 มิลลิลิตร อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส พีเอช 7.5 ความเร็วรอบ 220 รอบต่อนาที โดยศึกษา (1) ปริมาณไอโซยูจินอล 5, 10, 15, 20 กรัมต่อลิตร (2) ไดเมทธิลซัลฟอคไซด์เพื่อช่วยละลายไอโซยูจินอล 20 กรัมต่อลิตร ในสัดส่วนไอโซยูจินอลต่อไดเมทธิลซัลฟอคไซด์ 1:2, 1:4, 1:6, 1:8, 1:10 (โดยน้ำหนัก) และ (3) แอมเบอร์ไลท์ XAD-2 เรซิน 7, 15, 30% (โดยน้ำหนักเปียก) เพื่อลดผลการยับยั้งการผลิตจากสารผลิตภัณฑ์ วิเคราะห์ปริมาณวานิลลินด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) และคำนวณเป็นร้อยละผลผลิตในหน่วยโมล่าร์ เมื่อใช้สารตั้งต้น ไอโซยูจินอล 5 กรัมต่อลิตร *B. sphaericus* และ *Strep. peucetius* ผลิตวานิลลินได้สูงสุดประมาณร้อยละ 36 และ 48 ตามลำดับ การเติมไดเมทธิลซัลฟอคไซด์ในไอโซยูจินิล 20 กรัมต่อลิตร ด้วยอัตราส่วนไอโซยูจินอลต่อไดเมทธิล-ซัลฟอคไซด์ 1:2 สำหรับ *B. sphaericus* และ 1:4 สำหรับ *Strep. peucetius* ให้ผลผลิตวานิลลินสูงสุดใกล้เคียงกันประมาณ 4.2 กรัมต่อลิตร (ร้อยละ 23, วันที่ 11) และ 4.3 กรัมต่อลิตร (ร้อยละ 23, วันที่ 15) ตามลำดับ เมื่อเติมแอมเบอร์ไลท์เรซินร้อยละ 30 (โดยน้ำหนักเปียก) ณ วันที่ 10 ของการทดลอง *B. sphaericus* ผลิตวานิลลินได้สูงสุดประมาณ 3.7 กรัมต่อลิตร (ร้อยละ 13) ในขณะที่ *Strep. peucetius* ผลิตได้ประมาณ 3.6 กรัมต่อลิตร (ร้อยละ 16) วานิลลินที่ได้มีปริมาณต่ำเนื่องจากถูก

ดูดซับไว้บนแอมเบอร์ไลท์เรซิน และไม่สามารถแยกได้โดยใช้เอธิลอะซีเตท/เมทธานอลเป็นสารชะล้าง ซึ่งแยกได้เพียงร้อยละ 19 เมื่อทำการทดสอบโดยไม่เติมแอมเบอร์ไลท์เรซิน เติมไดเมทธิล-ซัลฟอคไซด์ในไอโซยูจินิล 5 กรัมต่อลิตร ในสัดส่วนไอโซยูจินอลต่อไดเมทธิลซัลฟอคไซด์ 1:2 สำหรับ *B. sphaericus* และ 1:4 สำหรับ *Strep. peucetius* พบว่า ณ วันที่ 15 ของการทดลอง *B. sphaericus* และ *Strep. peucetius* ผลิตวานิลลินได้สูงสุด 0.9 กรัมต่อลิตร (ร้อยละ20) และ 0.8 กรัมต่อลิตร (ร้อยละ18) ตามลำดับ อย่างไรก็ตามมีแนวโน้มว่าวานิลลินอาจผลิตได้เพิ่มขึ้นหลังวันที่ 15 ของการทดลอง จากผลการวิจัยจึงสรุปได้ว่า *Streptomyces peucetius* var. caesius TISTR 3355 ซึ่งเป็นสายพันธุ์จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย มีประสิทธิภาพในการผลิตวานิลลินจากไอโซยูจินอลมากกว่า *Bacillus sphaericus* ATCC 13805 การเติมไอโซยูจินอลและไดเมทธิลซัลฟอคไซด์ความเข้มข้นต่ำในระบบช่วยเพิ่มผลผลิตวานิลลินได้ อย่างไรก็ตามไดเมทธิลซัลฟอคไซด์อาจมีผลให้การผลิตวานิลลินช้าลง และแอมเบอร์ไลท์เรซินยังไม่เหมาะสมในการใช้เพิ่มผลผลิตวานิลลินภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงที่ทำการศึกษา เนื่องจากปลดปล่อยวานิล-ลินออกมาได้น้อย จึงควรศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มการผลิตวานิลลินเพิ่มเติมต่อไป

ABSTRACT

Title Effect of adsorbent resin and dimethyl sulfoxide on vanillin production by microbial biotransformaion

By Assist. Prof. Dr. Aurasorn Saraphanchotiwitthaya[1]

Assoc. Prof. Dr. Pattana Sripalakit[2]

Affiliation [1]Department of Pharmaceutical Technology,
Faculty of Pharmaceutical Sciences, Naresuan University

[2]Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmacognosy,
Faculty of Pharmaceutical Sciences, Naresuan University

Tel. 0-5596-1872

Financial support by Research Funds from Yearly Budget, Naresuan University, 2010

Duration 2 year

Vanillin (4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde) is one of the most important flavors and is widely used in the food industry. In this study, we optimized the culture conditions for vanillin production from isoeugenol using *Bacillus sphaericus* ATCC 13805 and *Streptomyces peucetius* var. caesius TISTR 3355 in 50-mL reaction solution at 30±2°C, pH 7.5 and 220 rpm. Various amount of (1) isoeugenol of 5, 10, 15, 20 g/L, (2) dimethylsulfoxide (DMSO) to solubilize 20 g/L isoeugenol with isoeugenol : DMSO ratio of 1:2, 1:4, 1:6, 1:8, 1:10 (by weight) and (3) amberlite XAD-2 resin of 7, 15, 30% (wet weight) to avoid the product inhibition on vanillin production were investigated. Vanillin formation was analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC) and %conversion of molar yield was calculated. Using 5 g/L isoeugenol as substrate, *B. sphaericus* and *Strep. peucetius* produced the maximal %conversion of vanillin at day 10, reaching 36% and 48%, respectively. Addition of DMSO to 20 g/L isoeugenol with isoeugenol:DMSO ratio of 1:2 for *B. sphaericus* and 1:4 for *Strep. peucetius* gave the highest vanillin concentration, reaching the similar yield of about 4.2 g/L (23%, day 11) and 4.3 g/L (23%, day 15), respectively. After 10 day reaction under the condition of adding 30% g of wet weight amberlite resin, the maximum vanillin concentration reached 3.7 g/L (13%) for *B. sphaericus* and 3.6 g/L (16%) for *Strep. peucetius*, respectively. Low vanillin yield may be due

to adsorbed vanillin in amberlite resin could not be well separated by eluting with ethyl acetate/methanol, showing the separation yield of approximately 19%. Under the optimized reaction conditions with the absence of amberlite, addition of DMSO to 5 g/L isoeugenol with isoeugenol: DMSO ratio of 1:2 for *B. sphaericus* and 1:4 for *Strep. peucetius* were studied. After 15-day reaction, *B. sphaericus* and *Strep. peucetius* produced the maximum vanillin yield of approximately 0.9 g/L (20%) and 0.8 g/L (18%), respectively. However, increasing of vanillin production after 15 day was suspected. It might be concluded that *Streptomyces peucetius* var. caesius TISTR 3355, cultured strain from Thailand Institute of Scientific and Technological Research (TISTR) was effective to produce vanillin from isoeugenol more than *Bacillus sphaericus* ATCC 13805. Addition of low concentration of isoeugenol and DMSO in culture medium could improve vanillin production. However, DMSO may delay vanillin production. Amberlite resin was not a good candidate to enhance vanillin production under this culture condition due to its low desorption. Optimization for higher yield of vanillin production needs to be further investigated.

หน้าสรุปรายงานวิจัย (Executive Summary)

สัญญาเลขที่	R2553B033
โครงการ	ผลของเรซินและไดเมทธิลซัลฟอคไซด์ต่อการผลิตวานิลลินโดยการไบโอทรานส์ฟอร์เมชันของจุลินทรีย์
หัวหน้าโครงการ	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อรสร สารพันโชติวิทยา
หน่วยงาน	ภาควิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
ระยะเวลาดำเนินงาน	2 ปี
งบประมาณ	300,000 บาท (สามแสนบาทถ้วน)

---

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหา

ในปัจจุบันเทคโนโลยีชีวภาพได้เข้ามามีบทบาทสำคัญในหลายสาขา รวมทั้งงานวิจัยด้านยาสมุนไพรและการเกษตร การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างหรือสังเคราะห์สารโดยอาศัยเทคโนโลยีการหมัก (fermentation) หรือไบโอทรานส์ฟอร์เมชันซึ่งอาศัยการเร่งปฏิกิริยาด้วยเอนไซม์หรือจุลินทรีย์ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อตำแหน่งการเกิดปฏิกิริยา และมีสารข้างเคียงที่เกิดขึ้นน้อย เมื่อเทียบกับการสังเคราะห์ผ่านขบวนการทางเคมี จึงนับเป็นทางเลือกใหม่ในการผลิตและสังเคราะห์สาร ซึ่งมีประสิทธิภาพและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม (Faber, 1992)

Vanillin (4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde) เป็นสารแต่งกลิ่นที่มีการนำมาใช้ปรุงแต่งอาหาร เครื่องดื่ม น้ำหอม รวมทั้งอุตสาหกรรมยา อย่างแพร่หลาย (Priefert et al., 2001) ในอดีต vanillin สกัดได้จากฝักวนิลา ซึ่งมีข้อจำกัดด้านผลผลิตฝักวนิลาที่ใช้เป็นวัตถุดิบ จึงมีราคาสูงถึงกิโลกรัมละ 3,000 เหรียญสหรัฐ และผลิตได้เพียงปีละ 20 ตัน (Walton et al., 2000) ต่อมาการผลิต vanillin โดยการสังเคราะห์ผ่านขบวนการทางปิโตรเคมีจึงเข้ามามีบทบาทในการเพิ่มผลผลิต vanillin สู่ท้องตลาด โดยมีผลผลิตเข้าสู่ตลาดมากถึงปีละ 10,000 ตัน (Priefert et al., 2001) อย่างไรก็ตาม vanillin ที่สังเคราะห์ได้โดยกระบวนการทางเคมีดังกล่าว นับว่ามีความสิ้นเปลืองด้านทรัพยากรและพลังงาน เป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดภาวะมลพิษ และภาวะโลกร้อนที่เป็นปัญหาระดับโลก ซึ่งต้องการความร่วมมือของมนุษยชาติในการดูแลแก้ไขอย่างเร่งด่วน นอกจากนี้การผลิต vanillin โดยการสังเคราะห์ทางเคมียังไม่สามารถตอบสนองกระแสความต้องการของผู้บริโภคในปัจจุบัน ซึ่งให้ความสำคัญกับการบริโภคทรัพยากรที่มาจากแหล่งธรรมชาติ ดังนั้นในปัจจุบัน

อุตสาหกรรมการผลิต vanillin โดยอาศัยเทคโนโลยีชีวภาพและใช้ประโยชน์จากจุลินทรีย์จึงได้รับความสนใจและพัฒนาตามลำดับ ทั้งนี้ผลผลิต vanillin ที่ได้จัดเป็น natural vanillin ตามกฎของ FDA (The Food and Drug Administration) และ EEC (European Economic Community) ซึ่งกำหนดให้ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ (natural product) หมายรวมถึงสารที่ได้จากส่วนของพืชหรือสัตว์ที่ผ่านกระบวนการทางกายภาพ เอนไซม์ หรือจุลินทรีย์ (Dignum et al., 2001; Priefert et al., 2001)

Isoeugenol เป็นสารในกลุ่ม phenylpropanoids ที่หาได้ง่าย เนื่องจากเป็นส่วนประกอบของน้ำมันหอมระเหยหลากหลายชนิดในธรรมชาติ เมื่อใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตเป็น vanillin ผ่านการไบโอทรานส์ฟอร์เมชันโดยจุลินทรีย์ จะมีมูลค่าเพิ่มขึ้นประมาณ 4-10 เท่า จึงนับว่ามีความคุ้มค่าแก่การลงทุน จึงมีการศึกษาการใช้จุลินทรีย์สายพันธุ์ต่างๆ เช่น *Bacillus sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Aspergillus niger* และ *Corynebacterium sp.* ในการผลิต vanillin เพื่อการเพิ่มมูลค่าสารตั้งต้น isoeugenol อย่างมากมายในปัจจุบัน (Priefert et al., 2001)

ประเทศไทยนับว่ามีความหลากหลายทางชีวภาพของพืชและสัตว์รวมทั้งจุลินทรีย์ ทรัพยากรธรรมชาติเหล่านี้ล้วนแล้วแต่เป็นรากฐานที่ดีในการสนับสนุนการพัฒนาประเทศอย่างยั่งยืน แต่ก็เป็นที่น่าเสียดายว่าประเทศไทยยังมีการนำเข้าสินเข้าประเภทเคมีภัณฑ์ รวมทั้ง vanillin เพื่อใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ ที่เกี่ยวข้องคิดเป็นมูลค่าสูงถึงมากกว่าเดือนละ 40,000 ล้านบาท (กรมศุลกากร, 2550) ดังนั้นการวิจัยเพื่อศึกษาไบโอทรานส์ฟอร์เมชันของ isoeugenol เพื่อพัฒนาการเพิ่มผลผลิต vanillin จึงมีความสำคัญและเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาเศรษฐกิจแบบพึ่งพาตนเอง หากประเทศไทยสามารถผลิต vanillin ได้ โดยใช้ทรัพยากรที่หาได้ในประเทศไทยเองด้วยแล้ว จะเป็นส่วนหนึ่งในการช่วยลดการนำเข้า และอาจพัฒนาไปถึงผลิต vanillin เพื่อส่งออกในอนาคต

2. วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาแนวทางการพัฒนาการเพิ่มผลผลิต vanillin โดยการศึกษาผลของ DMSO และ adsorbent resin ต่อการไบโอทรานสฟอร์เมชันของ isoeugenol

3. ผลการวิจัย

จากการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิต vanillin จาก isoeugenol โดยเชื้อ *B. sphaericus* และ *Strep. peucetius* พบว่าปริมาณ isoeugenol และ DMSO รวมทั้งการเติมสารดูดซับ (amberlite XAD-2 resin) ในระบบมีผลต่อการผลิต vanillin ปริมาณสารตั้งต้น isoeugenol ที่เหมาะสมในการผลิต vanillin คือ 5 g/L ซึ่ง *B. sphaericus* และ *Strep. peucetius* ผลิต vanillin ได้สูงสุด ณ วันที่ 10 ของการเพาะเลี้ยง โดยมี %conversion เท่ากับ 36.2 และ 47.7% ตามลำดับ สำหรับปริมาณ DMSO ที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการผลิต vanillin โดย *B. sphaericus* และ *Strep. peucetius* คือ isoeugenol: DMSO เท่ากับ 1:2 และ 1:4 โดยน้ำหนัก ซึ่งมีผลให้ได้ %conversion เท่ากับ 22.8 (วันที่ 11) และ

23.5 (วันที่ 15) ตามลำดับ ซึ่งปริมาณ vanillin ที่ผลิตได้เพิ่มขึ้นมากกว่าในระบบที่ไม่เติม DMSO ประมาณ 48.2 และ 46.4% ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างกันสำหรับการผลิตโดยเชื้อทั้งสองชนิด

การเติม amberlite resin เป็นสารดูดซับในระบบมีผลให้ *B. sphaericus* และ *Strep. peucetius* ผลิต vanillin เพิ่มขึ้นและสูงสุดเมื่อเติม amberlite 30% (wet weight) โดยมี %conversion 12.7 และ 16.4% ณ วันที่ 10 ตามลำดับ อย่างไรก็ตามปริมาณ vanillin ที่วิเคราะห์ได้นี้มีค่าต่ำกว่าระบบที่ไม่เติม amberlite เนื่องจาก amberlite ดูดซับ vanillin ไว้มากและไม่สามารถชะล้างได้อย่างสมบูรณ์ด้วย eluting solvents ที่ใช้ในการทดลอง จึงยังเป็นสภาวะที่ยังไม่เหมาะสมในการเพิ่มการผลิต vanillin

เมื่อใช้ isoeugenol 5 g/L ร่วมกับ DMSO ในอัตราส่วน isoeugenol: DMSO เท่ากับ 1:2 สำหรับ *B. sphaericus* และ 1:4 สำหรับ *Strep. peucetius* ตามลำดับ โดยไม่เติม amberlite พบว่า ณ วันที่ 15 *B. sphaericus* ผลิต vanillin ได้สูงสุด 0.92±0.023 g/L (%conversion = 20) และ *Strep. peucetius* ผลิต vanillin ได้สูงสุด 0.82±0.019 g/L (%conversion = 17.7) ตามลำดับ ซึ่งผลผลิต vanillin ที่ได้ต่ำกว่าระบบที่ใช้ isoeugenol 20 g/L แต่เติม DMSO ในอัตราส่วนเท่ากัน นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อทั้งสองชนิดผลิต vanillin ได้ช้าลง จึงคาดว่าหลังวันที่ 15 ของการทดลอง vanillin จะยังคงผลิตได้เพิ่มขึ้น

จากผลงานวิจัยดังกล่าว สรุปได้ว่าทั้ง *Bacillus sphaericus* ATCC 13805 และ *Streptomyces peucetius* var. caesius TISTR 3355 เป็นจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิต vanillin โดย *Strep. peucetius* เป็นสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตมากกว่า *B. sphaericus* ควรจำกัดปริมาณ isoeugenol ในการผลิตเนื่องจากข้อจำกัดของการละลาย หรือหากใช้ isoeugenol ปริมาณมาก ควรนำกลับมาใช้ซ้ำหรือผลิตแบบต่อเนื่อง การเติม dimethylsulfoxide เพื่อช่วยละลาย isoeugenol แม้จะช่วยเพิ่มการผลิต vanillin ได้ แต่มีผลให้เวลาในการผลิตยาวนานขึ้น จึงควรวิจัยการเพิ่มการละลาย isoeugenol ด้วยเทคนิคการเพิ่มการละลายอื่นๆ เพิ่มเติม และควรศึกษาชนิดของ adsorbent resin ที่ดูดซับ vanillin ได้ดี แต่สามารถชะล้างแยก vanillin ออกมาได้ง่ายด้วย eluting solvent ที่เหมาะสม เพื่อลดการสูญเสียผลผลิต

4. Output จากงานวิจัย

- องค์ความรู้ในการวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการใช้ประโยชน์ของเทคโนโลยีชีวภาพในการผลิต vanillin จาก isoeugenol โดยจุลินทรีย์ เพื่อบริการความรู้แก่ผู้สนใจ ตลอดจนภาคธุรกิจเพื่อการประยุกต์ใช้ในเชิงพานิชย์ โดยการเผยแพร่ผลงานวิจัยในที่ประชุมวิชาการ
- การสนับสนุนโครงงานวิจัยสำหรับนิสิตเภสัชศาสตร์

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ	I
บทคัดย่อ	II
Abstract	IV
หน้าสรุปรายงานวิจัย (Executive Summary)	VI
สารบัญตาราง	XII
สารบัญรูป	XIV
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์	2
1.3 ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย	2
1.4 แผนการดำเนินงานตลอดโครงการวิจัย	5
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ และหน่วยงานที่นำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์	5
1.6 แผนการถ่ายทอดเทคโนโลยีหรือผลการวิจัยสู่กลุ่มเป้าหมาย	6
1.8 ผลสำเร็จและความคุ้มค่าของการวิจัยที่คาดว่าจะได้รับ	6
บทที่ 2 ปริทัศน์วรรณกรรม	7
2.1 ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับไบโอทรานส์ฟอร์เมชัน	7
2.1.1 นิยามที่เกี่ยวข้อง	7
2.1.2 จุดมุ่งหมายของไบโอทรานส์ฟอร์เมชัน	7
2.1.3 ปฏิกิริยาที่เกี่ยวข้องในไบโอทรานส์ฟอร์เมชัน	7
2.1.4 ประโยชน์และข้อดีของไบโอทรานส์ฟอร์เมชัน	8
2.1.5 รูปแบบจุลินทรีย์ที่ใช้ในการไบโอทรานส์ฟอร์เมชัน	8
2.1.6 แนวทางการพัฒนากระบวนการไบโอทรานส์ฟอร์เมชัน	9
2.2 ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับ vanillin	10
2.3 ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับ isoeugenol	12
2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิต vanillin	13

หน้า

บทที่ 3 ระเบียบวิธีวิจัย 20

3.1 สารเคมี 20

3.2 จุลินทรีย์ 20

3.3 อุปกรณ์และเครื่องมือ 20

3.4 วิธีการทดลอง 21

3.4.1 การศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่มีผล ต่อการไบโอทรานส์ฟอร์เมชัน isoeugenol 21

การทดลอง 1: ผลของปริมาณ isoeugenol ต่อการไบโอทรานส์-ฟอร์เมชัน isoeugenol โดยจุลินทรีย์เพื่อผลิต vanillin 21

การทดลอง 2: ผลของปริมาณ DMSO ต่อการไบโอทรานส์ฟอร์-เมชัน isoeugenol โดยจุลินทรีย์เพื่อผลิต vanillin 21

การทดลอง 3: ผลของ amberlite ต่อการไบโอทรานส์ฟอร์เมชัน isoeugenol โดยจุลินทรีย์เพื่อผลิต vanillin 22

- การทดลอง 3.1 ประสิทธิภาพของ amberlite ในการดูดซับและปลดปล่อย isoeugenol และ vanillin 22

- การทดลอง 3.2 ผลของ n-hexane/methanol ในการชะล้าง isoeugenol และ vanillin จาก amberlite 23

- การทดลอง 3.3 ผลของ ethyl acetate/methanol ในการชะล้าง isoeugenol และ vanillin จาก amberlite 23

- การทดลอง 3.4 ผลของปริมาณ amberlite ต่อการไบโอทรานส์-ฟอร์เมชัน isoeugenol 24

การทดลอง 4: ผลร่วมของปริมาณ isoeugenol และ DMSO ต่อการผลิต vanillin ในการไบโอทรานส์ฟอร์เมชัน isoeugenol 25

3.4.2 การวิเคราะห์ปริมาณ isoeugenol และ vanillin ด้วยเทคนิค HPLC 25

3.5 การวิเคราะห์ข้อมูล 25

3.6 สถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล 26

3.7 ขอบเขตของการวิจัย 26

หน้า

บทที่ 4 รายงานผลการวิจัย 27

การทดลอง 1: ผลของปริมาณ isoeugenol ต่อการไบโอทรานส์ฟอร์เมชัน isoeugenol โดยจุลินทรีย์เพื่อผลิต vanillin 27

การทดลอง 2: ผลของปริมาณ DMSO ต่อการไบโอทรานส์ฟอร์เมชัน isoeugenol 35

การทดลอง 3: ผลของ amberlite ต่อการไบโอทรานส์ฟอร์เมชัน isoeugenol โดยจุลินทรีย์เพื่อผลิต vanillin 49

- การทดลอง 3.1 ประสิทธิภาพของ amberlite ในการดูดซับและปลดปล่อย isoeugenol และ vanillin 49

- การทดลอง 3.2 ผลของ n-hexane/methanol ในการชะล้าง isoeugenol และ vanillin จาก amberlite 51

- การทดลอง 3.3 ผลของ ethyl acetate/methanol ในการชะล้าง isoeugenol และ vanillin จาก amberlite 53

- การทดลอง 3.4 ผลของปริมาณ amberlite ต่อการไบโอ-ทรานส์ฟอร์เมชัน isoeugenol 55

การทดลอง 4: ผลร่วมของปริมาณ isoeugenol และ DMSO ต่อการผลิต vanillin ในการไบโอทรานส์ฟอร์เมชัน isoeugenol 55

บทที่ 5 อภิปรายผลการวิจัย

บทที่ 6 สรุปผลการวิจัย

บรรณานุกรม

ภาคผนวก

สารบัญตาราง

ตาราง		หน้า
2-1	ปฏิกิริยาที่เกี่ยวข้องในการไบโอทรานส์ฟอร์เมชัน	8
2-2	สมบัติทั่วไปของ vanillin	11
2-3	สมบัติทั่วไปของ isoeugenol	12
2-4	ผลการผลิต vanillin จาก isoeugenol โดยจุลินทรีย์สายพันธุ์ต่างๆ	15
4-1	ผลของปริมาณ isoeugenol ต่อการไบโอทรานส์ฟอร์เมชัน isoeugenol เพื่อผลิต vanillin โดย *B. sphaericus* และ *Strep. peucetius*	28
4-2	ปริมาณ vanillin และ %conversion สูงสุดที่ได้จากการศึกษาผลของปริมาณ isoeugenol ต่อการไบโอทรานส์ฟอร์เมชัน isoeugenol โดย *B. sphaericus* และ *Strep. peucetius*	33
4-3	ผลของปริมาณ DMSO ต่อการไบโอทรานส์ฟอร์เมชัน isoeugenol เพื่อผลิต vanillin โดย *B. sphaericus*	38
4-4	ผลของปริมาณ DMSO ต่อการไบโอทรานส์ฟอร์เมชัน isoeugenol เพื่อผลิต vanillin โดย *Strep. peucetius*	41
4-5	ปริมาณ vanillin และ %conversion สูงสุดที่ได้จากการศึกษาผลของปริมาณ DMSO ต่อการไบโอทรานส์ฟอร์เมชัน isoeugenol โดย *B. sphaericus* และ *Strep. peucetius*	47
4-6	ปริมาณ isoeugenol และ vanillin ที่วิเคราะห์ได้ จากการศึกษาประสิทธิภาพของ amberlite ในการดูดซับและปลดปล่อย isoeugenol และ vanillin (การทดลอง 3.1)	50
4-7	ปริมาณ isoeugenol และ vanillin ที่วิเคราะห์ได้จากการศึกษาผลของ n-hexane/methanol ในการชะล้าง isoeugenol และ vanillin จาก amberlite (การทดลอง 3.2)	52
4-8	ปริมาณ isoeugenol และ vanillin ที่วิเคราะห์ได้จากการศึกษาผลของ ethyl acetate/methanol ในการชะล้าง isoeugenol และ vanillin จาก amberlite (การทดลอง 3.3)	54

ตาราง **หน้า**

4-9	ปริมาณ isoeugenol และ vanillin ที่วิเคราะห์ได้จากการศึกษาผลของ ethyl acetate/methanol ในการชะล้าง isoeugenol และ vanillin จาก amberlite (การทดลอง 3.3)	55
4-10	ปริมาณ vanillin และ %conversion สูงสุดที่ได้จากการศึกษาผลร่วมของปริมาณ isoeugenol และ DMSO ต่อการไบโอทรานส์ฟอร์เมชัน isoeugenol โดย *B. sphaericus* และ *Strep. peucetius*	56

สารบัญรูป

รูป		หน้า
1-1	Microbial degradation ของ eugenol และ isoeugenol	3
2-1	แนวทางการพัฒนากระบวนการไบโอทรานส์ฟอร์เมชัน	9
2-2	โครงสร้างเคมีของสารที่พบในกลิ่นวนิลา	11
2-3	โครงสร้างทางเคมีของ isoeugenol	12
2-4	วิถีเมตาบอลิสมในการเปลี่ยนแปลง eugenol และ isoeugenol ของจุลินทรีย์	17
4-1	การเปลี่ยนแปลงปริมาณ isoeugenol และ vanillin ที่ได้จากการศึกษาผลของปริมาณ isoeugenol 5 (a), 10 (b), 15 (c) และ 20 (d) g/L ต่อการ ไบโอทรานส์ฟอร์เมชัน isoeugenol โดย *B. sphaericus* (BS) และ *Strep. peucetius* (SP)	30
4-2	การเปลี่ยนแปลงปริมาณ vanillin ณ เวลาต่างๆ จากการศึกษาผลของปริมาณ isoeugenol ต่อการ ไบโอทรานส์ฟอร์เมชัน isoeugenol โดย (a) *B. sphaericus* และ (b) *Strep. peucetius*	32
4-3	ปริมาณ vanillin สูงสุด (a) และ %conversion (b) ที่ได้จากการศึกษาผลของปริมาณ isoeugenol ต่อการไบโอทรานส์ฟอร์เมชัน isoeugenol โดย *B. sphaericus* และ *Strep. peucetius* (n = 3)	33
4-4	ตัวอย่าง HPLC-chromatogram แสดงตำแหน่งการเกิด peak ของ isoeugenol และ vanillin เมื่อใช้ isoeugenol ปริมาณ 5 g/L เป็นสารตั้งต้น ณ วันที่ 10 ของการทดลอง (a) *B. sphaericus* และ (b) *Strep. peucetius*	34
4-5	การเปลี่ยนแปลงปริมาณ isoeugenol และ vanillin ในการศึกษาผลของปริมาณ DMSO ต่อการไบโอทรานส์ฟอร์เมชัน isoeugenol โดย *B. sphaericus* เปรียบเทียบการไม่เติม DMSO (a) และ เติม DMSO ในอัตราส่วน isoeugenol : DMSO เท่ากับ 1:2 (b), 1:4 (c), 1:6 (d), 1:8 (e) และ 1:10 (f)	44
4-6	การเปลี่ยนแปลงปริมาณ isoeugenol และ vanillin ในการศึกษาผลของปริมาณ DMSO ต่อการไบโอทรานส์ฟอร์เมชัน isoeugenol โดย *Strep. peucetius* เปรียบเทียบการไม่เติม DMSO (a) และ เติม DMSO ในอัตราส่วน isoeugenol : DMSO เท่ากับ 1:2 (b), 1:4 (c), 1:6 (d), 1:8 (e) และ 1:10 (f)	45

รูป **หน้า**

4-7 การเปลี่ยนแปลงปริมาณ vanillin จากการศึกษาผลของปริมาณ DMSO ต่อการไบโอทรานส์ฟอร์เมชัน isoeugenol โดย *B. sphaericus* (a) และ *Strep. peucetius* (b) 46

4-8 ปริมาณ vanillin สูงสุด (a) และ %conversion (b) ที่ได้จากการศึกษาผลของปริมาณ DMSO ต่อการไบโอทรานส์ฟอร์เมชัน isoeugenol โดย *B. sphaericus* และ *Strep. peucetius* (n = 3) 47

4-9 ตัวอย่าง HPLC-chromatogram แสดงตำแหน่งการเกิด peak ของ isoeugenol และ vanillin เมื่อใช้ DMSO ในสัดส่วน isoeugenol : DMSO เท่ากับ 1:2 สำหรับ (a) *B. sphaericus* ณ วันที่ 11 ของการทดลอง และ 1:4 สำหรับ (b) *Strep. peucetius* ณ วันที่ 15 ของการทดลอง 48

4-10 ร้อยละการดูดซับ (%Adsorption) isoeugenol และ vanillin ของ amberlite จากการศึกษาประสิทธิภาพของ amberlite ในการดูดซับและปลดปล่อย isoeugenol และ vanillin (การทดลอง 3.1) เมื่อระบบ (1) ประกอบด้วย isoeugenol 20 g/L + vanillin 20 g/L + amberlite , ระบบ (2) ประกอบด้วย isoeugenol 20 g/L + amberlite , ระบบ (3) ประกอบด้วย vanillin 20 g/L + amberlite 51

4-11 ปริมาณ vanillin สูงสุด (a) และ %conversion (b) ที่ได้จากการศึกษาผลของปริมาณ DMSO ต่อการไบโอทรานส์ฟอร์เมชัน isoeugenol โดย *B. sphaericus* และ *Strep. peucetius* (n = 3) 56