บทที่ 1
บทนำ

1.1 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 ดังนั้นในปัจจุบันอุตสาหกรรมการผลิต 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 ที่หาได้ง่ายเนื่องจากเป็นส่วนประกอบของน้ำมันหอมระเหยหลากหลายชนิดในธรรมชาติ เมื่อใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตเป็น vanillin ผ่านการไบโอทรานส์ฟอร์เมชันโดยจุลินทรีย์ จะมีมูลค่าเพิ่มขึ้นประมาณ 4-10 เท่า จึงนับว่ามีความคุ้มค่า

แก่การลงทุน 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

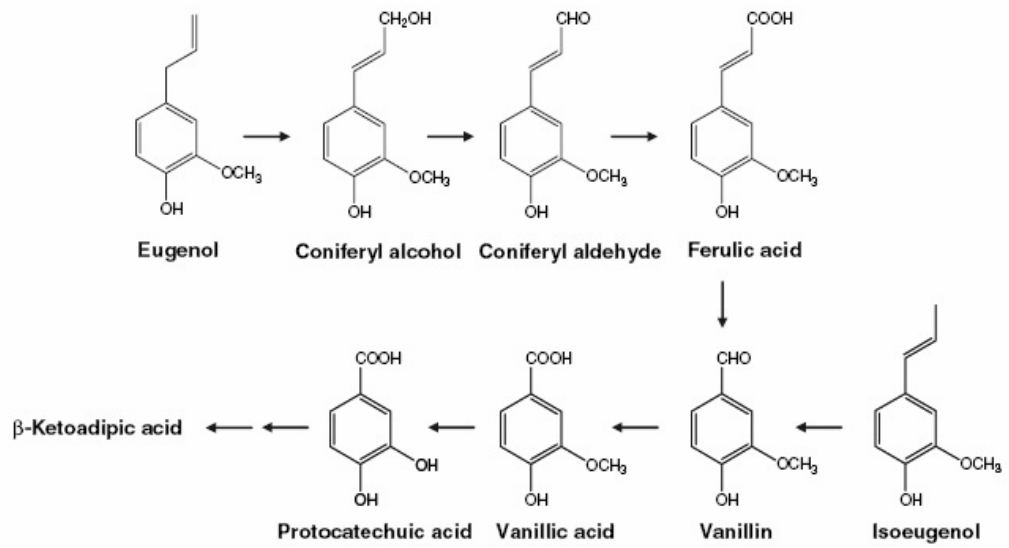
1.2 วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาแนวทางการพัฒนาการเพิ่มผลผลิต vanillin โดยการศึกษาผลของ DMSO และ adsorbent resin ต่อการไบโอทรานสฟอร์เมชันของ isoeugenol

1.3 ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

การผลิต vanillin ในปัจจุบันสามารถทำได้ทั้งจากการสกัดผลึก vanillin จากเมล็ดและฝักของต้นวนิลา ขบวนการทางปิโตรเคมี และการสังเคราะห์โดยขบวนการไบโอทรานส์ฟอร์เมชัน แต่เนื่องจาก vanillin ที่ได้จากการสกัดจากฝักวนิลานั้นมีราคาแพง การสังเคราะห์ vanillin ด้วยขบวนการทางปิโตรเคมีเพื่อลดต้นทุนการผลิต จึงเข้ามามีบทบาทสำคัญมากขึ้น ทั้งนี้การสังเคราะห์ทางเคมีดังกล่าวแม้ว่าจะช่วยลดต้นทุนการผลิตได้มาก แต่ก็สิ้นเปลืองพลังงาน และก่อให้เกิดมลภาวะต่อสิ่งแวดล้อม ดังนั้นการสังเคราะห์ vanillin โดยขบวนการไบโอทรานส์ฟอร์เมชันจึงเข้ามามีบทบาทสำคัญในการเป็นตัวเลือกในการผลิต vanillin ในปัจจุบัน ซึ่งเทคโนโลยีดังกล่าวนอกจากจะเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมแล้วยังสามารถตอบสนองความต้องการของผู้บริโภคซึ่งให้ความสำคัญกับการบริหารทรัพยากรที่มาจากแหล่งธรรมชาติมากกว่าการสังเคราะห์

สารตั้งต้นในการผลิต vanillin โดยการไบโอทรานส์ฟอร์เมชันนั้น มีหลายชนิด เช่น ferulic acid, eugenol และ isoeugenol ในงานวิจัยนี้เลือกใช้ isoeugenol เป็นสารตั้งต้น เนื่องจาก isoeugenol หาได้ง่าย และราคาไม่แพง เนื่องจากเป็นส่วนประกอบของน้ำมันหอมระเหยหลายชนิดในธรรมชาติ นอกจากนี้ยังมีขั้นตอนการเปลี่ยนโครงสร้าง (metabolic pathway) ไปเป็น vanillin ได้ง่ายกว่า eugenol (รูป 1-1) และมีราคาถูกกว่า ferulic acid



รูป 1-1 Microbial degradation ของ eugenol และ isoeugenol (Yamada et al., 2008)

มีรายงานการใช้จุลินทรีย์สายพันธุ์ต่างๆ ที่มีความสามารถในการผลิต vanillin เช่น *Corynebacterium sp.* (Tadasa, 1977), *Pseudomonas sp.* (Tasada and Kayahara et al., 1983) และ *Arthrobacter globiformis* (Cooper, 1987), *Serratia marcescens* DSM 30126 (Hopp, 1993), *Pseudomonas putida*, *Corynebacterium glutamicum* (Labuda et al., 1993) และ P*seudomonas sp.* TK 2102 (FERM P-12689) (Washisu et al., 1993) รวมทั้งจุลินทรีย์สายพันธุ์ *Bacillus sp.* (Shimoni et al., 2000; Hua et al., 2007)

งานวิจัยนี้เลือกใช้ *Bacillus sphaericus* ATCC 13805 ในการทดสอบ เนื่องจากมีความเป็นไปได้ในการผลิต vanillin จากการผลการทดลองเบื้องต้นพบว่าสามารถผลิต vanillin ได้แต่ยังมีร้อยละผลผลิต (%yield) ไม่สูงนัก ทั้งนี้มีรายงานความไม่คงตัวของ vanillin ที่สลายตัวต่อ ได้สารอื่นอีกหลายชนิด เช่น vanillic acid, coniferyl alcohol, coniferyl aldehyde และ protocatechuate (Perestelo et al., 1989; Bare et al., 1992) *Aspergillus niger* ATCC 9142 ก็สามารถเปลี่ยน isoeugenol ไปเป็น vanillin ได้เช่นกัน แต่มีผลผลิตเพียงร้อยละ 10 เท่านั้น เนื่องจาก vanillin ส่วนหนึ่งสลายตัวต่อได้ vanillyl alcohol และ vanillic acid (Abraham et al., 1988) นอกจากนี้ยังมีรายงานการผลิต vanillin จาก isoeugenol โดยใช้ *P. putida* I58 ได้ vanillic acid เป็นสารผลิตภัณฑ์หลัก โดยไม่พบการสะสมของ vanillin (Furukawa et al., 2003) ในขณะที่การใช้ *Arthrobacter sp.* ในการผลิตได้ทั้ง vanillin และ vanillic acid เป็นสารผลิตภัณฑ์ (Shimoni et al., 2003)

จากรายงานดังกล่าวจะเห็นได้ว่าปัญหาหลักของการผลิต vanillin โดยการไบโอทรานส์ฟอร์เมชันนั้น คือการสลายตัวของ vanillin เกิดเป็น degradation products ที่ไม่ต้องการ และมีผลให้ร้อยละผลผลิตของ vanillin ลดลงอย่างมาก จึงมีการใช้สารดูดซับ (adsorbent resin) เพื่อ

ช่วยลดการสลายตัวของ vanillin และเพิ่มร้อยละผลผลิตของ vanillin มีรายงานการใช้ adsorbent resin หลายชนิดเช่น rein HD-8 (Zhao et al., 2006) และ macroporous adsorbent resin DM11 (Hua et al., 2007) ในการดูดซับ vanillin เพื่อลดความเป็นพิษของ vanillin ต่อจุลินทรีย์ และเพิ่มความคงตัวของ vanillin โดยมีผลยับยั้งการสลายตัวของ vanillin ไปเป็น degradation products อื่นๆ เช่น vanillic acid นอกจากนี้ยังช่วยให้การแยก vanillin จากระบบสามารถทำได้ง่ายขึ้น ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงศึกษาการเติม adsorbent resin ใน culture medium เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการเพิ่มผลผลิต vanillin ด้วย

นอกจากนี้อุปสรรคในการผลิต vanillin ที่สำคัญอีกประการหนึ่งคือความสามารถในการละลายน้ำของสารตั้งต้น isoeugenol ดังนั้นการเติมสารช่วยละลายเพื่อช่วยละลาย isoeugenol จึงน่าจะช่วยให้การผลิต vanillin สมบูรณ์มากขึ้น ทั้งนี้ Yamada และคณะ (2007) ได้รายงานผลการไบโอทรานสฟอร์เมชัน isoeugenol โดย *Pseudomonas putida* IE27 ซึ่งได้สารผลิตภัณฑ์เป็น vanillin และ vanillic acid และรายงานผลของ DMSO ในการช่วยละลาย isoeugenol และช่วยเพิ่มการผลิต vanillin ดังนั้นในงานวิจัยนี้ ผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาผลของสารช่วยละลายในการเพิ่มการผลิต vanillin โดยใช้ DMSO เป็นสารช่วยละลายต้นแบบ

การควบคุมสภาวะที่เหมาะสมในขบวนการไบโอทรานส์ฟอร์เมชัน (optimization) โดยการใช้ adsorbent resin และการใช้ DMSO เป็นสารช่วยละลาย isoeugenol จึงน่าจะช่วยให้การผลิต vanillin มีประสิทธิภาพมากขึ้น ผลงานวิจัยดังกล่าวจึงนับว่าเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาเศรษฐกิจอย่างยั่งยืน ในระยะยาว หากประเทศไทยสามารถผลิต vanillin ได้เอง จะสามารถช่วยลดการนำเข้า และอาจพัฒนาไปถึงการเป็นผู้ผลิต vanillin เพื่อส่งออกในอนาคต

1.4 แผนการดำเนินงานตลอดโครงการวิจัย

แผนการดำเนินงานวิจัย	เดือนที่											
	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24
1. เตรียมความพร้อมการวิจัย - จัดหาสารเคมี, จุลินทรีย์ และวัสดุอุปกรณ์ที่เกี่ยวข้อง - การศึกษาเบื้องต้น (preliminary study) เช่น HPLC condition สำหรับการวิเคราะห์ isoeugenol และ vanillin, การแยกสกัด isoeugenol และ vanillin	←	→										
2. ศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการผลิต vanillin จากไบโอทรานส์ฟอร์เมชัน isoeugenol 2.1 ผลของ DMSO 2.2 ผลของปริมาณ isoeugenol 2.3 สมบัติของ amberlite ในการดูดซับและปลดปล่อย isoeugenol และ vanillin 2.4 ผลของ amberlite 2.5 ผลร่วมระหว่างปริมาณ isoeugenol, DMSO และ amberlite			←	→	←	→	←	→	←	→	←	→
3. รายงาน สรุปและประเมินผล											←	→
4. เสนอผลงานในที่ประชุม											←	→

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ เช่น การเผยแพร่ในวารสาร จดสิทธิบัตร ฯลฯ และหน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

1.5.1 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- องค์ความรู้ในการวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการใช้ประโยชน์ของเทคโนโลยีชีวภาพในการผลิต vanillin จาก isoeugenol โดยจุลินทรีย์ เพื่อบริการความรู้แก่ผู้สนใจ ตลอดจนภาคธุรกิจเพื่อการประยุกต์ใช้ในเชิงพานิชย์ โดยการเผยแพร่ผลงานวิจัยในที่ประชุมวิชาการ
- การสนับสนุนโครงงานวิจัยสำหรับนิสิตเภสัชศาสตร์

1.5.2 หน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

- นิสิต คณาจารย์ นักวิจัยคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
- ภาคธุรกิจและหน่วยงานที่สนใจ

1.6 แผนการถ่ายทอดเทคโนโลยีหรือผลการวิจัยสู่กลุ่มเป้าหมาย

กลุ่มเป้าหมาย 1	นิสิตคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
วิธีการถ่ายทอด	การเรียนการสอนหัวข้อปัญหาพิเศษ/โครงงานวิจัย
ระยะเวลา	1 ภาคการศึกษา (6 เดือน)
สถานที่	คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
กลุ่มเป้าหมาย 2	คณาจารย์ นักวิจัย ผู้สนใจ และภาคธุรกิจ
วิธีการถ่ายทอด	การเผยแพร่ผลงานวิชาการในการประชุมวิชาการ การตีพิมพ์ผลงานวิจัยในวารสารระดับประเทศและ/หรือระดับนานาชาติ
ระยะเวลา	หลังการวิจัยเสร็จสิ้น
สถานที่	สถานที่จัดประชุมวิชาการ/สำนักพิมพ์/วารสารที่เกี่ยวข้อง

1.7 ผลสำเร็จและความคุ้มค่าของการวิจัยที่คาดว่าจะได้รับ

ผลสำเร็จในงานวิจัยนี้อยู่ในระดับ P หรือ ผลสำเร็จเบื้องต้น (Preliminary results) ซึ่งสามารถพัฒนาการวิจัยแบบต่อยอดได้ โดยมีผลผลิต (output) ที่ได้จากงานวิจัยอย่างเป็นรูปธรรม ได้แก่ vanillin ที่ได้จากการผลิตด้วยเทคโนโลยีชีวภาพ รวมทั้งแนวทางการพัฒนาการผลิต vanillin เพื่อเพิ่มมูลค่าผลิตภัณฑ์สารตั้งต้น isoeugenol ซึ่งมีราคาถูกกว่า จึงมีความคุ้มค่าในเชิงพานิชย์ และการพัฒนาพื้นฐานเทคโนโลยีเพื่อการแข่งขันในอนาคต

บทที่ 2
ปริทัศน์วรรณกรรม

2.1 ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับไบโอทรานส์ฟอร์เมชัน

2.1.1 นิยามศัพท์ที่เกี่ยวข้อง มีดังนี้

"เทคโนโลยีชีวภาพ (Biotechnology)" หมายถึงเทคโนโลยีการสร้างผลิตภัณฑ์ที่ใช้ประโยชน์ได้โดยอาศัยสิ่งมีชีวิตหรือเพียงบางส่วนของสิ่งมีชีวิต เป็นเทคโนโลยีที่มีประสิทธิภาพสูง สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในงานหลายสาขา เช่น เกษตร สาธารณสุข และอุตสาหกรรม

"ไบโอทรานส์ฟอร์เมชัน (Biotransformation)" เป็นเทคโนโลยีชีวภาพแขนงหนึ่งที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการที่ใช้เปลี่ยนแปลงสารตั้งต้นอย่างจำเพาะ ให้เป็นสารผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ โดยอาศัยเซลล์พืช สัตว์ หรือจุลินทรีย์ รวมถึงการใช้เอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

2.1.2 จุดมุ่งหมายของไบโอทรานส์ฟอร์เมชัน ได้แก่

(1) การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสารตั้งต้นอย่างจำเพาะด้วยปฏิกิริยาที่เหมาะสม

(2) การเปลี่ยนแปลงสารตั้งต้นบางส่วน เพื่อให้ได้ metabolites โดยการควบคุมปฏิกิริยาของเซลล์เพาะเลี้ยงหรือควบคุมวิถีการเกิดปฏิกิริยา

(3) การใช้ปฏิกิริยาชีวสังเคราะห์เพื่อผลิตสารใหม่

2.1.3 ปฏิกิริยาที่เกี่ยวข้องในไบโอทรานส์ฟอร์เมชัน เกิดได้จาก

(1) เอนไซม์ที่มีอยู่แล้วของจุลินทรีย์ (constitutive enzymes)

(2) เอนไซม์ที่ถูกกระตุ้นขึ้นภายหลัง (inducible enzymes)

การสังเคราะห์สารผลิตภัณฑ์อาจเป็นไปเพื่อการดำรงชีวิตหรือการเพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์เอง หรือเป็นสารที่ได้จากการเมทาบอลิสมของจุลินทรีย์ที่เรียกว่า secondary metabolites อย่างไรก็ตาม นอกจากสารผลิตภัณฑ์หลักแล้ว อาจพบสารอื่นๆ ที่มีโครงสร้างใกล้เคียงสารผลิตภัณฑ์หลักปนอยู่ได้เช่นกัน (Suresh et al., 2006) ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างการไบโอทรานส์ฟอร์เมชันของจุลินทรีย์ แสดงดังตาราง 2-1

ตาราง 2-1 ปฏิกิริยาที่เกี่ยวข้องในการไบโอทรานส์ฟอร์เมชัน (Suresh et al., 2006)

Oxidations	Hydroxylation, epoxidation, oxidation of alcohols and aldehydes, oxidative degradation of alkyl, carboxyalkyl or ketoalkyl chains, oxidative removal of substitutes, oxidative deamination
Reductions	Reduction of organic acid, aldehydes, ketones and hydrogenation of C=C bonds, reduction of hetero functions, dehydroxylation, reductive elimination of substituents
Hydrolysis	Hydrolysis of ester, amines, amides, lactones, ethers, lactams; hydration of C=C bonds and epoxides
Condensation	Dehydration, O- and N-acylation, glycosidation, esterification, lactonization, amination
Isomerization	Migration of double bonds or oxygen functions, racemization, rearrangements

2.1.4 ประโยชน์และข้อดีของไบโอทรานส์ฟอร์เมชัน (Suresh et al., 2006) ได้แก่

(1) การสังเคราะห์สารใหม่

(2) การช่วยเพิ่มความสามารถในการผลิต (productivity) สารที่ต้องการ

(3) การช่วยลดปัญหาที่เป็นผลจากการสังเคราะห์ทางเคมี

(4) การได้มาซึ่งข้อมูลของวิถีชีวสังเคราะห์ (biosynthetic pathways)

(5) เป็นการลด byproduct ลดความต้องการพลังงาน และลดต้นทุนการผลิต เนื่องจากการเร่งปฏิกิริยาเกิดขึ้นในสภาวะที่ไม่รุนแรง เช่น อุณหภูมิห้อง โดยไม่ต้องการความดันสูง

(6) ไบโอทรานส์ฟอร์เมชันสามารถทำได้โดยไม่ขึ้นกับปัจจัยทางภูมิศาสตร์ หรือการเปลี่ยนแปลงฤดูกาล และสิ่งแวดล้อม

(7) การช่วยให้การผลิตเกิดได้อย่างรวดเร็ว

2.1.5 รูปแบบจุลินทรีย์ที่ใช้ในการไบโอทรานส์ฟอร์เมชัน (Suresh et al., 2006) ได้แก่

(1) Growing Culture (เซลล์อิสระที่อยู่ระหว่างการเจริญ)

(2) Resting Cells (เซลล์ในระยะพัก ไม่มีการเจริญ)

(3) Immobilized Cells (เซลล์ตรึง)

(4) Purified Enzymes (เอนไซม์บริสุทธิ์)

(5) Multiphase Systems (ระบบหลายวัฏภาค)

(6) Two sequential Systems (ระบบการเลี้ยงแบบสองขั้นต่อเนื่อง)

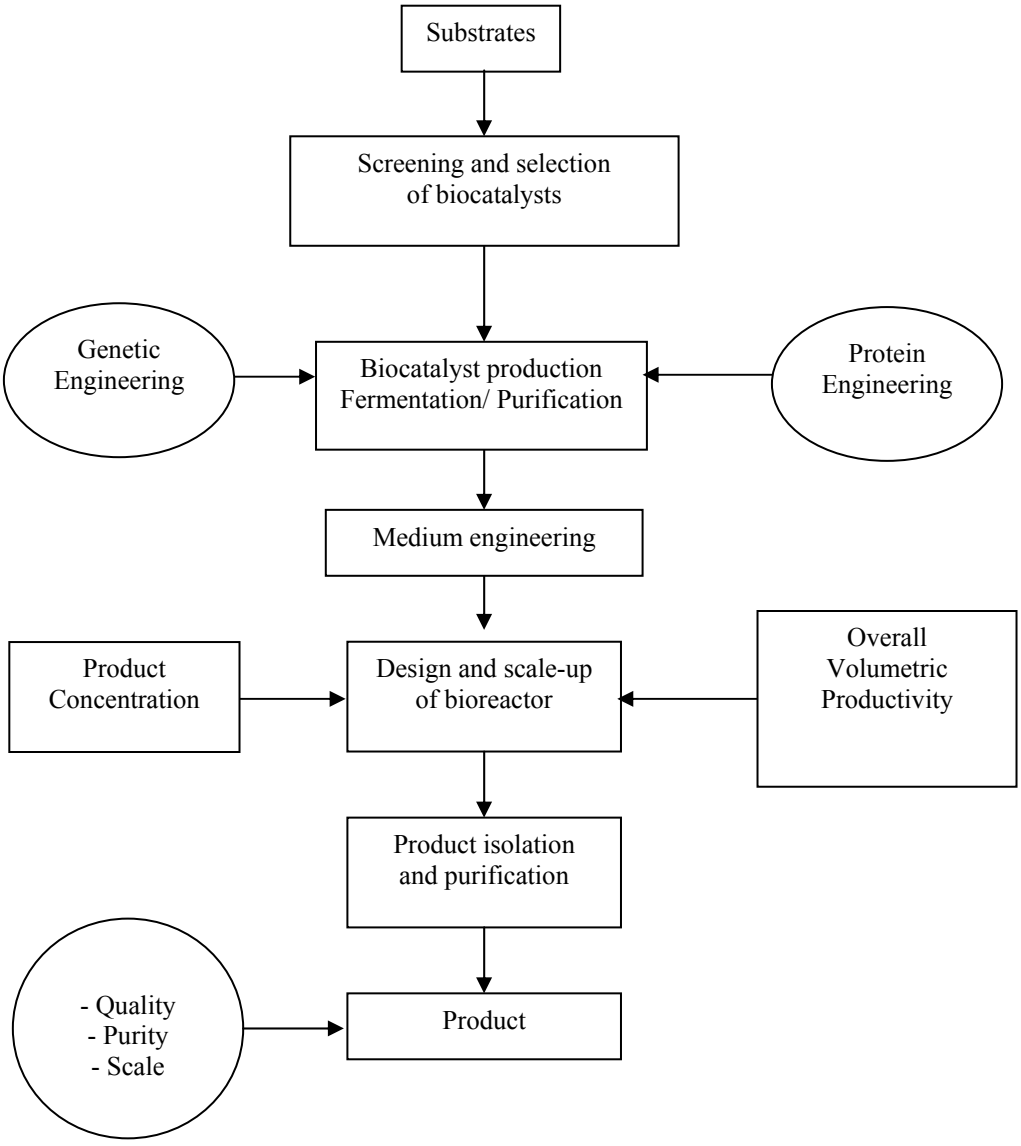
2.1.6 แนวทางการพัฒนากระบวนการไบโอทรานส์ฟอร์เมชัน (Suresh et al., 2006) ทำได้ดังนี้

(1) การหาสภาวะที่เหมาะสมในการไบโอทรานส์ฟอร์เมชัน เช่น ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ, อุณหภูมิ, pH และปริมาณออกซิเจนที่ละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อ (ความเร็วในการเขย่า flask)

(2) การปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์ โดยการคัดเลือกจุลินทรีย์สายพันธุ์ใหม่ หรือทำให้จุลินทรีย์เกิดการกลายพันธุ์

(3) การลดปฏิกิริยาข้างเคียง (side-reaction) เช่น การใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมเพื่อยับยั้งการสังเคราะห์เอนไซม์ที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาข้าง เคียง

แนวทางในการพัฒนากระบวนการไบโอทรานส์ฟอร์เมชัน แสดงได้ดังรูป 2-1



รูป 2-1 แนวทางการพัฒนากระบวนการไบโอทรานส์ฟอร์เมชัน (Cabral, 2001)

2.2 ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับ vanillin

Vanillin (4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde) เป็นสารแต่งกลิ่นที่มีการนำมาใช้ปรุงแต่งอาหาร เครื่องดื่ม น้ำหอม รวมทั้งอุตสาหกรรมยาอย่างแพร่หลาย (Priefert et al., 2001) vanillin สกัดได้จากฝักวนิลา มีต้นกำเนิดจากประเทศ เม็กซิโก (Mexico) เป็นพืชที่จัดอยู่ในวงศ์ *Orchidaceae* ซึ่งได้รับการค้นพบกว่า 110 สายพันธุ์ แต่มีเพียง 3 สายพันธุ์เท่านั้น ที่มีรายงานการนำมาใช้ในทางอุตสาหกรรม คือ *Vanilla fragrans* (Salisbury) Ames (*V. planifolia* Andrews), *V. pompona* Schiede และ *V. tahitensis* JW Moore สายพันธุ์ที่มีการนำมาใช้ประโยชน์เป็นสารแต่งกลิ่นและสารปรุงแต่งในอาหารมากที่สุด คือ สายพันธุ์ *V. planifolia* ซึ่งสกัด vanillin ได้ 20 g จากฝักวนิลาแห้ง 1 Kg

กลิ่นวนิลา ใช้ประโยชน์สำหรับแต่งกลิ่นรสอาหาร เครื่องสำอางและยา ได้จากผลึกของ vanillin ซึ่งมีอยู่ในเมล็ดและฝักของต้นวนิลา (*Vanilla fragrans* (Salisb)) ผลิตได้โดยการนำฝักวนิลาสดมาทำการบ่ม (curing) ด้วยกรรมวิธีหรือเทคนิคต่างๆ

ต้นวนิลามีถิ่นกำเนิดที่ประเทศเม็กซิโก เป็นไม้เลื้อยอยู่ตามธรรมชาติในป่า จัดอยู่ในวงศ์ Orchidaceae ออกดอกเมื่ออายุ 3 ปี มีการปลูกวนิลาในเกาะเรอูนียง เกาะมาดากัสการ์ หมู่เกาะคอโม-โรส ส่วนในประเทศเขตร้อน มีการปลูกในประเทศอินโดนีเซีย ศรีลังกา อินเดีย ตาฮิติ แต่คุณภาพของวนิลาที่ผลิตได้จากประเทศเขตร้อน ผลผลิตจะต่ำกว่าจากเกาะมาดากัสการ์ หมู่เกาะคอโมโรส และเกาะเรอูนียง โดยราคาฝักวนิลาจากเกาะมาดากัสการ์ ราคากิโลกรัมละ 2,000 บาท และจากอินโดนีเซีย ราคากิโลกรัมละ 1,500 บาทและผลิตได้เพียงปีละ 20 ตัน (Walton et al., 2000) สำหรับประเทศไทยก็มีการนำวนิลาพันธุ์การค้า มาทดลองปลูก ปรากฏว่าเจริญเติบโตได้ดี อย่างไรก็ตามการติดฝักจำเป็นต้องใช้คนช่วยผสมเกสร และใช้เวลาถึง 9 เดือนฝักจึงสุกแก่พร้อมที่จะเก็บเกี่ยวได้ (พนัส, 2542) ดังนั้น vanillin ที่ได้จากการสกัดจากต้นวนิลาจึงค่อนข้างมีราคาแพง

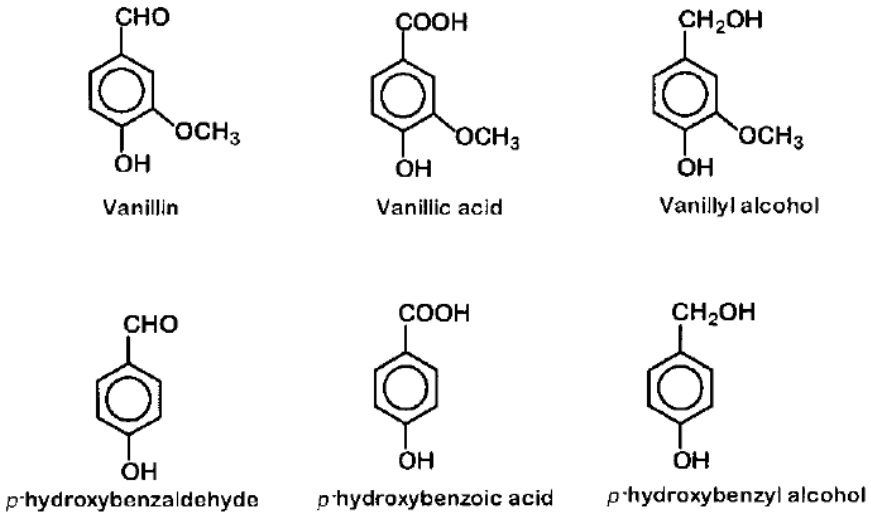
ต่อมาการผลิต vanillin โดยการสังเคราะห์ผ่านขบวนการทางปิโตรเคมีจึงเข้ามามีบทบาทในการเพิ่มผลผลิต vanillin สู่ท้องตลาด โดยมีผลผลิตเข้าสู่ตลาดมากถึงปีละ 10,000 ตัน (Priefert et al., 2001) อย่างไรก็ตาม vanillin ที่สังเคราะห์ได้โดยกระบวนการทางเคมีดังกล่าว มีความสิ้นเปลืองทรัพยากรและพลังงาน เป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดภาวะมลพิษ และภาวะโลกร้อนที่เป็นปัญหาระดับโลก ซึ่งต้องการความร่วมมือของมนุษยชาติในการดูแลแก้ไขอย่างเร่งด่วน นอกจากนี้การผลิต vanillin โดยการสังเคราะห์ทางเคมียังไม่สามารถสนองต่อกระแสความต้องการของผู้บริโภคในปัจจุบัน ซึ่งให้ความนิยมการบริโภคทรัพยากรที่มาจากแหล่งธรรมชาติมากกว่าสารสังเคราะห์ ดังนั้นเทคโนโลยีชีวภาพโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์จึงเข้ามามีบทบาทสำคัญในการเป็นตัวเลือกในการผลิต vanillin ในปัจจุบัน ซึ่งมีข้อดีด้านเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม และตอบสนองความต้องการของผู้บริโภคซึ่งให้ความสำคัญกับการบริหารทรัพยากรที่มาจากแหล่งธรรมชาติมากกว่าการสังเคราะห์

ในปัจจุบัน อุตสาหกรรมการผลิต vanillin ผ่านกระบวนการทางเทคโนโลยีชีวภาพ ซึ่งหมายรวมถึงการผลิต vanillin โดยใช้ประโยชน์จากจุลินทรีย์จึงได้รับความสนใจและพัฒนาเป็นลำดับ vanillin เป็นสารที่ได้มาจากกระบวนการ biodegradation ของสารธรรมชาติหลายชนิด เช่น stilbenes, eugenol, ferulic acid และ lignin ทั้งนี้ผลผลิต vanillin ที่ได้จัดว่าเป็น natural vanillin ตามกฎของ FDA (Food and Drug Administration) และ EEC (European Economic Community) ซึ่งกำหนดให้ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ (natural product) หมายรวมถึงสารที่ได้จากส่วนของพืชหรือสัตว์ที่ผ่านกระบวนการทางกายภาพ เอนไซม์ หรือจุลินทรีย์ (Dignum et al., 2001; Priefert et al., 2001)

สมบัติโดยทั่วไปของ vanillin แสดงดังตาราง 2-2 และสารที่พบในกลิ่นวนิลาแสดงดังรูป 2-2

ตาราง 2-2 สมบัติทั่วไปของ vanillin (Budavari et al., 1996)

สมบัติ	รายละเอียด
สูตรเคมี	$(CH_3O)C_6H_3(OH)CHO$
Molecular Weight	152.15
Physical State	white or slightly yellow needles
Appearance	clear yellow
Flash Point	not found
Melting Point	80-81 °C
Vapor Pressure	2.2×10^3 mm Hg at 25 °C
Specific Gravity	1.056 g/ml
Boiling Point	285 °C
Water Solubility	1 g/100 mL



รูป 2-2 โครงสร้างเคมีของสารที่พบในกลิ่นวนิลา

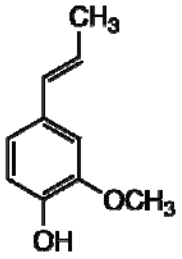
2.3 ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับ isoeugenol

Isoeugenol (2-Methoxy-4-(1-propenyl)-phenol หรือ 2-Methoxy-4-(1-propenyl) phenol; 4-Propenylguaiacol; 2-Methoxy-4-propenylphenol; 4-Hydroxy-3-methoxy-1-propenylbenzene; 4-Propenyl-2-methoxyphenol; 1-hydroxy-2-methoxy-4-propenyl-(cis)benzene; 1-Hydroxy-2-methoxy-4- propen-1-yl benzene (Hua, et al., 2007)) เป็นสารในกลุ่ม simple phenolic compounds (lignin-related phenylpropanoids) (Evans , 1992) พบได้ในพืชหลายชนิด เช่น ดอกกานพลู (*Zysygium aromaticum*) (Buckingham, 1994) ดอกกระดังงาไทย (*Cananga odorata*) และลูกจันทน์เทศ (*Myristica fragrans*) รวมทั้งได้จากปฏิกิริยา isomerization ของ eugenol

เมื่อใช้ isoeugenol เป็นสารตั้งต้นในการผลิต vanillin โดยการไบโอทรานสฟอร์เมชันโดยจุลินทรีย์ จะมีมูลค่าเพิ่มขึ้นประมาณ 4-10 เท่า จึงมีงานวิจัยการใช้จุลินทรีย์สายพันธุ์ต่างๆ ในการเปลี่ยนสารตั้งต้น isoeugenol เป็น vanillin (Priefert et al., 2001) เพื่อเพิ่มมูลค่าผลิตภัณฑ์ สมบัติทั่วไปของ isoeugenol แสดงดังตาราง 2-3 และโครงสร้างทางเคมีของ isoeugenol แสดงดังรูป 2-3

ตาราง 2-3 สมบัติทั่วไปของ isoeugenol (Cameo Chemicals, 2007)

สมบัติ	รายละเอียด
สูตรเคมี	$C_{10}H_{12}O_2$
Molecular Weight	164.20
Physical State	Liquid
Appearance	clear yellow
Flash Point	235.0 ° F
Melting Point	14.0 ° F
Vapor Pressure	0.02 mm Hg at 77.0 ° F
Specific Gravity	1.08 at 77.0 ° F
Boiling Point	511.0 ° F at 760 mm Hg
Water Solubility	Slightly soluble



รูป 2-3 โครงสร้างทางเคมีของ isoeugenol

2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิต vanillin

ในระยะแรกของการศึกษาไบโอทรานส์ฟอร์เมชันของ eugenol และ isoeugenol นักวิจัยพบว่าจุลินทรีย์หลายสายพันธุ์สามารถเปลี่ยนสารตั้งต้นในกลุ่ม phenylpropanoids เช่น eugenol และ isoeugenol ไปเป็น vanillin ได้ เช่น *Corynebacterium sp.* (Tadasa, 1977), *Pseudomonas sp.* (Tadasa and Kayahara et al., 1983) และ *Arthrobacter globiformis sp.* (Cooper, 1987) สามารถเปลี่ยนสารตั้งต้น eugenol ไปเป็นสารหอมระเหย (aromatic compounds) หลายชนิดผ่านขบวนการ degradation เช่น vanillin, vanillic acid, coniferyl alcohol และ coniferyl aldehyde แต่สารหอมระเหยที่ได้นั้นมักไม่คงตัวและสลายตัวต่อไปอีก เกิดเป็น vanillic acid และ protocatechuate ตามลำดับ (Perestelo et al., 1989; Bare et al., 1992) *Aspergillus niger* ATCC 9142 ก็สามารถเปลี่ยน isoeugenol ไปเป็น vanillin ได้เช่นกัน แต่ได้ผลผลิต (%yield) เพียงร้อยละ 10 เท่านั้น เนื่องจาก vanillin ส่วนหนึ่งสลายตัวต่อได้ vanillyl alcohol และ vanillic acid (Abraham et al., 1988)

ต่อมา มีรายงานประสิทธิภาพของจุลินทรีย์สายพันธุ์อื่นๆ ในการไบโอทรานส์ฟอร์เมชัน eugenol และ isoeugenol เพิ่มมากขึ้น ซึ่งบางสายพันธุ์ยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน และบางสายพันธุ์เคยมีรายงานการศึกษาแล้ว แต่มีการพัฒนาเพิ่มร้อยละผลผลิต เช่น *Serratia marcescens* DSM 30126 (Hopp, 1993), *Pseudomonas putida*, *Corynebacterium glutamicum* (Labuda et al., 1993) และ P*seudomonas sp*. TK 2102 (FERM P-12689) (Washisu et al., 1993)

Shimoni และคณะ (2000) ได้คัดแยกจุลินทรีย์จากดินบริเวณต้น *Ocimum basilicum* และ *Artemisia drancunculus* เทียบกับ *Serratia odorifera* ATCC 33077 และ *Serratia ficaria* ATCC 33105 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีรายงานว่าสามารถผลิต vanillin จาก isoeugenol ได้ เมื่อวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่ได้ด้วย TLC พบว่าสายพันธุ์ B1, B2, B3, B4, และ BS6A สามารถสร้าง vanillin ได้ในสารละลายที่มี isoeugenol โดยจุลินทรีย์สายพันธุ์ B2 สามารถผลิต vanillin ได้สูงสุด ต่อมาพบว่าคือ *Bacillus subtilis* และได้มีการนำมาใช้ในการไบโอทรานส์ฟอร์เมชัน isoeugenol ไปเป็น vanillin โดยใช้เซลล์ทั้งในรูปแบบ growing culture และ cell free extract

ผลจากการใช้ growing culture ของ *B. subtilis* ในกระบวนการไบโอทรานส์ฟอร์เมชัน พบว่า isoeugenol มีอัตราการสลายตัวใน 24 ชั่วโมงแรกเท่ากับ 0.21 g /L/h จากนั้นลดลงเป็น 0.028 g/L/h ส่วนอัตราการผลิต vanillin ใน 24 ชั่วโมงแรกเท่ากับ 0.025 g/L/h ด้วยค่า molar efficiency ร้อยละ 12 ส่วนการใช้ cell free extract พบอัตราการสลายของ isoeugenol เท่ากับ 0.29 g/L/h ระหว่าง 32 ชั่วโมงแรก ส่วน vanillin ผลิตด้วยอัตราเร็ว 0.019 g/L/h และได้ความเข้มข้นสูงสุด 0.9 g/L ใน 48 ชั่วโมง ด้วย molar efficiency เท่ากับร้อยละ 14 และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ แสดงให้เห็นว่า การเปลี่ยน isoeugenol ไปเป็น vanillin เกิดจากเอนไซม์ในชั้นน้ำ นอกจากนี้ Shimoni และคณะ ยังพบว่า isoeugenol กว่าร้อยละ 80 มีการเสื่อมสลายไป มีเพียงร้อยละ 5 เท่านั้นที่เปลี่ยนไปเป็น vanillin จึงทำให้ผลผลิต vanillin ต่ำ และ isoeugenol เองอาจเป็นปัจจัยจำกัดการเจริญ (growth

limiting factor) ของจุลินทรีย์ และการเติม 10% w/w amberlite XAD-2 เป็นสารดูดซับ (adsorbent) ช่วยให้จุลินทรีย์เจริญดีขึ้น

ในปี 2003 Shimoni และคณะรายงานว่าจุลินทรีย์สายพันธุ์อื่นๆ เช่น *P. putida* I58 ไบโอทรานส์ฟอร์ม isoeugenol ได้ vanillic acid เป็นผลิตภัณฑ์หลัก ซึ่ง Furukawa และคณะ (2003) ไม่พบการสะสมของ vanillin ในขณะที่ *Arthrobacter sp.* ผลิตได้ทั้ง vanillin และ vanillic acid (Shimoni et al., 2003) Zhao และคณะ (2006) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการไบโอทรานส์ฟอร์-เมชันเพื่อผลิต vanillin จาก isoeugenol โดย *B. fusiformis* CGMCC 1347 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิต vanillin พบว่าสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการผลิต vanillin คือการใช้ isoeugenol 60% (v/v), pH 4.0, อุณหภูมิ 37 ºC, และความเร็วรอบ 180 rpm ซึ่งได้ผลผลิต vanillin สูงสุด 3.75 g/L ณ เวลา 72 ชั่วโมง ต่อมา Zhao และคณะ (2006) พบอีกว่าการผลิต vanillin ไม่สัมพันธ์กับการเจริญของ *B. fusiformis* และการใช้สารดูดซับมีผลเพิ่มผลผลิต vanillin ได้ ซึ่ง resin HD-8 มีประสิทธิภาพสูงสุดในการดูดซับ vanillin และ HD-8 12.5 g มีผลให้การผลิต vanillin เท่ากับ 7.56 g/ L ณ เวลา 72 ชั่วโมงและ 8.10 g/L หลัง 72 ชั่วโมง ส่วนระบบที่ไม่เติม HD-8 มีผลให้การผลิต vanillin เท่ากับ 1.42 g/L ณ เวลา 96 ชั่วโมงและสรุปว่า การเติม resin HD-8 ในปริมาณที่เหมาะสมช่วยเพิ่มผลผลิต vanillin ได้ถึงร้อยละ 78 โดยการลดผลของ product inhibition และทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีความคงตัว และช่วยให้การแยก vanillin จาก culture medium สามารถทำได้ง่ายขึ้น

นอกจากนี้ Hua และคณะ (2007) ได้รายงานการเพิ่มผลผลิต vanillin จากไบโอทรานส์ฟอร์เมชันของ ferulic acid โดยเชื้อ *Streptomyces sp.* โดยศึกษาจาก macroporous adsorbent resin หลายชนิด พบว่าชนิด DM11 มีประสิทธิภาพในการเพิ่มร้อยละการผลิต vanillin ได้ร้อยละ 54.5 และในปี 2008 นี้เอง มีรายงานการใช้เทคนิคการตัดต่อ gene โดยใช้ *E. coli* และแยก isoeugenol monooxygenase gene จาก *Pseudomonase putida* IE27 ซึ่งพบว่ามีประสิทธิภาพในการผลิต vanillin ได้สูงถึงร้อยละ 81 โดยไม่มีการสลายตัวไปเป็น vanillic acid และ acetaldehyde (Yamada et al., 2008)

ในปี 2007 Hua และคณะรายงานว่าจุลินทรีย์ใน species *Bacillus* อีกชนิดหนึ่งคือ *B. pumilus* สามารถสังเคราะห์ vanillin จากสารตั้งต้น isoeugenol ได้สูงถึงร้อยละ 40.5 ภายใน 150 ชั่วโมง นอกจากจุลินทรีย์ในกลุ่ม *Bacillus* แล้ว ยังมีรายงานประสิทธิภาพของจุลินทรีย์สายพันธุ์อื่นๆ ในการผลิต vanillin จาก isoeugenol เช่น Kasana และคณะ (2007) ได้ศึกษาหาสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่สามารถเปลี่ยน isoeugenol ไปเป็น vanillin และพยายามลดข้อจำกัดจากงานวิจัยก่อนหน้านี้ ทั้งความเป็นพิษของสารตั้งต้นและผลิตภัณฑ์ต่อจุลินทรีย์ และการสลายของ vanillin ไปเป็น vanillyl alcohol และ vanillic acid ซึ่งทำให้ vanillin ที่ผลิตได้จาก isoeugenol มี % molar yield ต่ำ Kasana และคณะใช้จุลินทรีย์จากตัวอย่างดินของ *Ocimum* ซึ่งเป็นแหล่งของ phenylpropanoids รวมถึง isoeugenol ผลการศึกษาพบว่าจุลินทรีย์สายพันธุ์ CDAE 5 สามารถผลิต vanillin ได้ปริมาณ

สูงสุด ต่อมาพบว่าคือ *Pseudomonas chlororaphis* และได้นำมาใช้ในการไบโอทรานส์ฟอร์ม isoeugenol ในช่วงความเข้มข้น 0.5 - 2.0% และพบว่า isoeugenol 1.0% ให้ yield สูงสุดเท่ากับ 1.2 g/L (% molar efficiency 12.64) ใน 24 ชั่วโมง เป็นไปได้ว่า isoeugenol ความเข้มข้นสูงอาจเป็นพิษต่อจุลินทรีย์

ในปีเดียวกันนี้เอง Yamada และคณะ (2007) ได้รายงานผลการคัดเลือกแบคทีเรีย 20 สายพันธุ์ ที่มีความสามารถในการผลิต vanillin ทั้งที่แยกได้จากดินและเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการผลการศึกษา พบว่าจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์มีความสามารถในการผลิต vanillin และ vanillic acid แตกต่างกัน โดย resting cell ของ *P. putida* IE27 ที่แยกได้จากดินสามารถผลิต vanillin ได้สูงสุดคิดเป็น 2.01 nmol/ min/ mL ผลการผลิต vanillin โดยจุลินทรีย์สายพันธุ์ต่างๆ แสดงดังตาราง 2-4

ตาราง 2-4 ผลการผลิต vanillin จาก isoeugenol โดยจุลินทรีย์สายพันธุ์ต่างๆ (Yamada et al., 2007)

Microorganism	Vanillin (mM)	Vanillic acid (mM)
Soil isolate		
Pseudomonas putida IE27	10.0	1.39
19 other isolates	0–0.161	0–0.104
Laboratory collection		
Achromobacter cycloclastes IAM1013	0	0.026
Aeromonas hydrophila IFO3820	0.027	0
Agrobacterium tumefaciens 14B-1	0.359	0.493
Alcaligenes faecalis JM3-5	0.845	0
Alcaligenes sp. IFO14479	0.024	0
Arthrobacter nicotianae FI1612	0.064	0
Bacillus sphaericus IFO3525	0.754	0
Bacillus sphaericus IFO3526	0.059	0
Bacillus sphaericus IFO3528	0.062	0
Micrococcus luteus IFO3066	0.040	0
Micrococcus luteus IFO3067	0.042	0
Pseudomonas fluorescens IFO12055	0.172	0
Pseudomonas fragi IFO3458	0.041	0
Pseudomonas putida AN12	0.672	0
Pseudomonas sp. E26-1	0	0.026
Rhodobacter sphaeroides NBRC12203	0.006	0.024
Rhodococcus rhodochrous J1	0.299	0.187

The resting cells reaction was carried out for 24 h under standard reaction conditions.

ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต vanillin โดย *P. putida* IE27 โดยศึกษาผลของความเข้มข้น isoeugenol อุณหภูมิ และความเข้มข้นของ dimethyl sulfoxide (DMSO) พบว่าปริมาณ isoeugenol ที่เพิ่มขึ้นจาก 30 ถึง 200 mM มีผลให้ผลผลิต vanillin สูงขึ้น โดยความเข้มข้นของ isoeugenol ที่สูงขึ้นนั้นมีผลยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของ vanillin ไปเป็น vanillic acid ส่วนผลของอุณหภูมิที่ใช้เพาะเลี้ยง resting cell ที่ 20 ºC เป็นเวลา 30 นาทีไม่ทำให้สูญเสียแอคติวิตี้ (no loss activity) แต่ที่อุณหภูมิ 25, 30, 45 และ 50 ºC พบการสูญเสียแอคติวิตี้เริ่มต้น (losses of intitial activity) ร้อยละ 15, 28, 30 และ 100 ตามลำดับ สำหรับ DMSO ที่ความเข้มข้น 10% (v/v) ให้ผลผลิต vanillin สูงสุด อันเนื่องมาจากการยับยั้งการเกิด vanillic acid

เมื่อศึกษาไบโอทรานฟอร์เมชันของ isoeugenol ไปเป็น vanillin โดยใช้ isoeugenol ความเข้มข้น 150 mM อุณหภูมิ 20 ºC ร่วมกับ 10% (v/v) DMSO พบว่าภายใน 24 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง vanillin มีความเข้มข้นสูงสุด 106 mM (16.1g/L) คิดเป็น molar conversion yield เท่ากับ 71% ซึ่ง vanillin ที่เกิดขึ้นนั้นพบว่ามีสถานะของแข็งอยู่ด้วย เนื่องจากละลายน้ำได้น้อย

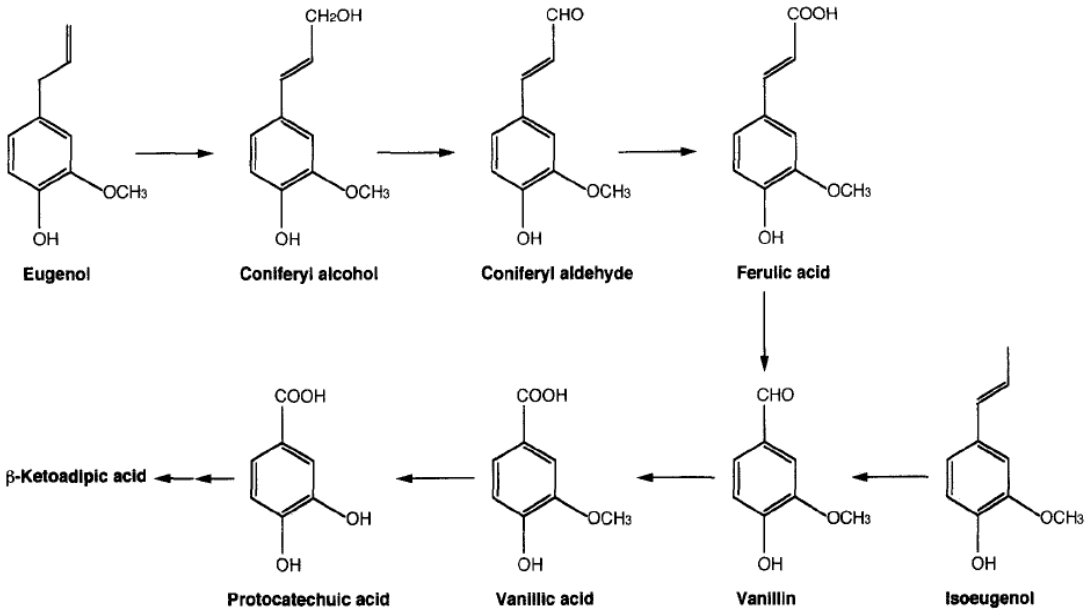
เมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาของ Zhao และคณะ (2005) ซึ่งศึกษาการผลิต vanillin โดย *B. fusiformis* CGMCC 1347 และ ใช้ isoeugenol 60% (v/v) เป็นสารตั้งต้นและตัวกลางในระบบตัวกลางสองวัฏภาค (two phase system) พบว่าได้ผลผลิต vanillin สูงถึง 32.5 g/L ภายหลัง 72 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง โดย isoeugenol ทำหน้าที่เป็นตัวทำละลายที่ใช้สกัด vanillin ด้วย Yamada และคณะ (2007) วิจารณ์ว่า *P. putida* IE27 เองก็เป็นสายพันธุ์ที่ให้ผลผลิต vanillin สูงเช่นกัน และวิธีการใช้ DMSO เป็นสารช่วยละลาย isoeugenol ในน้ำ น่าจะเป็นวิธีที่เหมาะสมมากกว่าการใช้ isoeugenol ปริมาณมากในระบบสองวัฏภาคตามการศึกษาของ Zhao และคณะ ซึ่ง reaction mixture มีความข้นหนืดมาก ทำให้แยก vanillin ออกได้ยาก และค่า % conversion น้อยมาก

Yamada และคณะ อภิปรายว่าในกรณี *P. putida* IE27 isoeugenol ความเข้มข้นสูงสามารถยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของ vanillin เป็น vanillic acid ได้ ซึ่งต่างจากรายงานการศึกษาของ Furukawa และคณะ (2003) ซึ่งกล่าวว่า กรณี *P. putida* I58 กลไกการออกซิเดชันของ vanillin มีความไวต่อ isoeugenol น้อย ดังนั้น isoeugenol ความเข้มข้นสูง จึงไม่สามารถยับยั้งการออกซิเดชันของ vanillin ได้ ส่วน DMSO ช่วยการละลายของ isoeugenol ในน้ำ ทำให้ความเข้มข้นของ isoeugenol สูงขึ้น และสามารถยับยั้งการเกิด vanillic acid ได้ในที่สุด

ในปี 2003 Furukawa และคณะ รายงานวิถีเมตาบอลิสม (metabolic pathway) จากไบโอ-ทรานส์ฟอร์เมชันโดย *P. putida* I58 และใช้สารที่มีโครงสร้างในกลุ่ม eugenol เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า *P. putida* I58 ใช้ isoeugenol, vanillin และ vanillic acid เป็นแหล่งคาร์บอน แต่ไม่ใช้ eugenol, coniferyl alcohol, coniferyl aldehyde และ ferulic acid ซึ่งเป็นสารตัวกลาง (intermediate) ในกระบวนการ degradation ของ eugenol เป็นแหล่งคาร์บอน ทำให้เกิดสมมติฐานว่า isoeugenol

ถูกเปลี่ยนไปเป็น vanillin ได้โดยไม่ผ่านการสร้าง ferulic acid ดังแสดงในรูป 2-4 เมื่อนำ *P. putida* I58 ชนิด resting cells มาศึกษาการไบโอทรานส์ฟอร์เมชันของ isoeugenol พบว่า *P. putida* I58 สามารถเปลี่ยน isoeugenol ไปเป็น vanillic acid ได้อย่างรวดเร็วภายในเวลา 40 นาที โดยมี % molar conversion yield สูงถึงร้อยละ 98 และเมื่อทดลองใช้ vanillin เป็นสารตั้งต้น พบว่า vanillin จะถูกเปลี่ยนไปเป็น vanillic acid ได้อย่างสมบูรณ์

เมื่อ Furukawa และคณะ (2003) ทดลองควบคุมสภาวะไบโอทรานส์ฟอร์เมชันให้ปราศจากออกซิเจน พบว่าไม่มีการสร้าง vanillin หรือ vanillic acid เกิดขึ้น แสดงให้เห็นว่าการเปลี่ยน isoeugenol ไปเป็น vanillic acid เกิดผ่านปฏิกิริยา oxidation



รูป 2-4 วิถีเมตาบอลิสมในการเปลี่ยนแปลง eugenol และ isoeugenol ของจุลินทรีย์ (Furukawa et al., 2003)

นอกจากนี้ เมื่อทดลองเปลี่ยนมาใช้ eugenol เป็นสารเหนี่ยวนำจุลินทรีย์ก่อนเข้าสู่สภาวะพักแทน isoeugenol พบว่าไม่เกิดการไบโอทรานส์ฟอร์เมชันทั้ง isoeugenol และ vanillin แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ที่ใช้ในการเปลี่ยน isoeugenol ไปเป็น vanillin จะต้องได้รับการเหนี่ยวนำโดย isoeugenol เท่านั้น Furukawa และคณะจึงสรุปว่า isoeugenol สามารถเปลี่ยนไปเป็น vanillin ได้โดยตรง โดยไม่ผ่านวิถีการเปลี่ยน eugenol ทั้งนี้หากสามารถระบุวิถีเมตาบอลิสม และเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในปฏิกิริยาได้ ก็จะสามารถหาแนวทางยับยั้งการเกิด vanillic acid ซึ่งสามารถประยุกต์ใช้ในการผลิต vanillin ในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

เนื่องจาก isoeugenol มีความเป็นพิษต่อจุลินทรีย์ด้วย การคัดเลือกจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่มีความทนต่อ isoeugenol จึงเป็นแนวทางการพัฒนาไบโอทรานส์ฟอร์เมชันของ isoeugenol ที่สำคัญ Zhang และคณะ (2006) ได้คัดกรองจุลินทรีย์จากดินที่ทนต่อ isoeugenol 10 g/L และมีความสามารถในการไบโอทรานส์ฟอร์เมชันสูงสุดในเวลา 3 วัน หลังจากวิเคราะห์เพื่อระบุสายพันธุ์พบว่าคือ *Bacillus subtilis* HS8 และเมื่อนำ growing culture ของ *B. subtilis* HS8 มาไบโอทรานส์ฟอร์ม isoeugenol ณ อุณหภูมิ 30 °C ความเร็วรอบ 120 rpm พบว่าใน 48 ชั่วโมงแรก isoeugenol ร้อยละ 79.3 ถูกเปลี่ยนแปลงด้วยอัตราเร็ว 0.17 g/L/h หลังจากนั้นอัตราเร็วจะลดลง โดยความเข้มข้นของ vanillin สูงสุดเกิดขึ้นเท่ากับ 1.36 g/L ที่ 96 ชั่วโมง และกล่าวว่า vanillin ความเข้มข้นต่ำที่วิเคราะห์ได้ใน control แสดงถึงการปนเปื้อนของ isoeugenol ที่นำมาใช้ในการวิเคราะห์ (ความบริสุทธิ์ 97%) ภายหลังกระบวนการไบโอทรานส์ฟอร์เมชันเสร็จสิ้น (8 วัน) คณะนักวิจัยได้เก็บตัวอย่างที่เหลือจาก flask เพื่อนำไปวิเคราะห์โดยเทคนิค GC-HRMS (Gas-chromatography High Resolution Mass Spectroscopy) พบ vanillin, dehydrodyisoeugenol และวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HRMS พบ isoeugenol-diol ตามลำดับ นอกจากนี้ Zhang และคณะ (2006) ยังได้ศึกษาวิถีการเปลี่ยนแปลงของ isoeugenol ผ่านการเกิด metabolites โดยใช้ resting cells ของ *B. subtilis* HS8 ที่เหนี่ยวนำด้วย isoeugenol ใช้ vanillin และ vanillic acid เป็นสารตั้งต้น ผลการทดลองพบว่ามีสาร guaiacol และ vanillyl alcohol เกิดขึ้น

ในปี 2007 Hua และคณะได้คัดเลือกจุลินทรีย์จากดินที่มีความสามารถในการไบโอทรานส์-ฟอร์ม isoeugenol ไปเป็น vanillin พบว่า *Bacillus pulmilus* strain S-1 เป็นสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพสูงสุด โดยสภาวะการไบโอทรานส์ฟอร์เมชันที่เหมาะสมคือ ความเร็วรอบ 200 rpm อุณหภูมิ 30 °C ใน GY medium ซึ่งให้ผลผลิต vanillin สูงสุดเท่ากับ 3.75 g/L คิดเป็นร้อยละของ vanillin ในหน่วยโมลาร์เท่ากับ 40.5 ในเวลา 150 ชั่วโมง

นอกจากนี้ Hua และคณะยังได้ศึกษา metabolites ที่เกิดขึ้นโดย *B. fulmilus* strain รูปแบบ resting cells เมื่อวิเคราะห์โดยเทคนิค TLC พบสาร 3 ชนิด คือ isoeugenol, vanillin และ vanillic acid และเมื่อวิเคราะห์โดยเทคนิค GC-MS, GC-HRMS พบ metabolites ที่เกิดขึ้นในกระบวนการไบโอทรานส์ฟอร์เมชันของ isoeugenol คือ vanillic acid, eugenol, dehydrodiisoeugenol, isoeugeno-epoxide และ isoeugenol-diol

งานวิจัยดังกล่าวมีประเด็นที่น่าสนใจคือการพบสาร dehydrodiisoeugenol (DDI) ซึ่งเกิดจากกระบวนการ bipolymerization ของ isoeugenol และเป็น byproduct ที่ไม่ต้องการ เนื่องจาก DDI ที่เกิดขึ้นนี้ไม่สามารถถูกเปลี่ยนไปเป็น vanillin ได้ ทำให้เกิดการสูญเสีย isoeugenol ไปมากกว่าร้อยละ 10 ดังนั้นคณะนักวิจัยจึงได้พยายามศึกษากลไกการเกิด DDI เพื่อลดการสูญเสีย isoeugenol จากกระบวนการดังกล่าว ผลการทดลองดังกล่าวทำให้ Hua และคณะสรุปว่า วิถีการเปลี่ยนแปลง isoeugenol น่าจะเกิดผ่าน epoxide-diol pathway เช่นเดียวกับการเปลี่ยนแปลงของสาร

ในกลุ่ม prophenylbenzenes ทั่วไป เช่น *trans*-anethole และ eugenol โดยวิถีการเปลี่ยนแปลง isoeugenol ไปเป็น vanillin

ปัจจุบันยังไม่พบรายงานการศึกษาที่กล่าวถึงเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในปฏิกิริยาการไบโอทรานส์ฟอร์เมชันของ isoeugenol ไปเป็น vanillin ที่ชัดเจน อย่างไรก็ตามมีการตั้งสมมุติฐานว่าเอนไซม์ monooxygenases (peroxidases) และ epoxide hydrolases น่าจะมีบทบาทในปฏิกิริยาดังกล่าว เนื่องจากปฏิกิริยา epoxidation และ hydrolysis ของพันธะคู่ที่ side chains สามารถพบได้ในสารที่มีโครงสร้างใกล้เคียงกับ isoeugenol เช่น *trans*-anethole, eugenol และ safrole

จากรายงานผลการศึกษาไบโอทรานสฟอร์เมชันของ isoeugenol จะเห็นได้ว่าเป็นงานวิจัยที่ยังอยู่ในช่วงการพัฒนา ทั้งในด้านการค้นหาจุลินทรีย์สายพันธุ์ใหม่ๆ ที่มีประสิทธิภาพในการผลิต vanillin รวมทั้งการควบคุมสภาวะที่เหมาะสมในขบวนการไบโอทรานส์ฟอร์เมชัน และการใช้เทคนิคการตัดต่อ gene เพื่อเพิ่มผลผลิต vanillin ซึ่งเป็นงานวิจัยที่ยังสามารถพัฒนาต่อไปได้ ดังนั้นในงานวิจัยนี้ ผู้วิจัยจึงได้ผนวกองค์ความรู้จากการทบทวนวรรณกรรม และนำมาประยุกต์ใช้เพื่อพัฒนาการเพิ่มผลผลิต vanillin โดยการใช้ทรัพยากรและเทคโนโลยีภายในประเทศเป็นพื้นฐานในการพัฒนา

บทที่ 3
ระเบียบวิธีวิจัย

3.1 สารเคมี

- Acetic acid (J.T.Baker, Thailand)
- Ammonium sulfate ($(NH4)_2SO_4$) (BDH Laboratory Supplies, England)
- Isoeugenol (98%, cis-/trans-mixt) (Merck, Darmstadt, Germany)
- Magnesium chloride ($MgCl_2$) (BDH Laboratory Supplies, England)
- Methanol (RCI Labscan, Thailand)
- Phosphate buffer saline (PBS) solution (Sigma, USA)
- Tris-HCl buffer (Sigma, USA)
- Vanillin (99%) (Merck, Darmstadt, Germany)
- Yeast extract (Fluka, Steinheim, Spain)
- Amberlite XAD-2 (supelco,USA)

3.2 จุลินทรีย์

(1) *Bacillus sphaericus* ATCC 13805

แหล่งที่มา: American Type Culture Collection (ATCC)

สภาวะการเพาะเลี้ยง: Tryptic soy agar (TSA), 37.0 °C

(2) *Streptomyces peucetius* var. caesius TISTR 3355

แหล่งที่มา: ศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)
(Thailand Institute of Scientific and Technological Research; TISTR)

สภาวะการเพาะเลี้ยง: Tryptic soy agar (TSA), 37.0 °C

3.3 อุปกรณ์และเครื่องมือ

- Autoclave (HA-300P, Hirayama Manufacturing Corporation, Japan)
- High-performance liquid chromatography (HPLC) (Shimadzu, Japan)
  - Pump (LC-20 AT, Shimadzu, Japan)
  - UV Detector (SPD-20 A, Shimadzu, Japan)
  - System Controller (Model SPD-20 A, Shimadzu, Japan)

- Autosample (SIL-10ADVp, Shimadzu, Japan)
- Oven (CTO-10ASVp, Shimadzu, Japan)

- HPLC column Lichrosphere 100 RP-18 column (250 x4 mm i.d., 5 μ° particle size) (Phenomenex, USA)
- Laminar air flow cabinet (1185, Forma Scientific Inc., Ohio, USA)
- Orbital shaker (COS 47OVBA, Revco Scientific Inc., N.C., USA)
- Micropipette (Rainin, USA)

3.4 วิธีการทดลอง

3.4.1 การศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการไบโอทรานส์ฟอร์เมชัน isoeugenol

<u>การทดลอง 1</u> ผลของปริมาณ isoeugenol ต่อการไบโอทรานส์ฟอร์เมชัน isoeugenol โดยจุลินทรีย์เพื่อผลิต vanillin (Yamada et al., 2007)

(1) เติม cell suspension จาก stock culture 1 mL (1×10^5 cell/mL) ลงใน 250-mL Erlenmeyer flask ที่บรรจุ cultivation medium (Yeast extract 5 g/L, $(NH_4)_2SO_4$ 3 g/L, $MgCl_2$ 0.1 g/L, 50 mM Tris-HCl buffer pH 7.5 (7.88g/l) ปริมาตร 48 mL เขย่าด้วยความเร็วรอบ 220 rpm อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

(2) เติม isoeugenol 5, 10, 15, 20 g/L ปรับปริมาตรให้ครบ 50 mL ด้วย sterile culture medium เขย่า flask ด้วยความเร็วรอบ 220 rpm ณ อุณหภูมิห้อง ด้วย orbital shaker

(3) เก็บตัวอย่างครั้งละ 500 μL ในวันที่ 1 - 15 (day 1- day 15) นับจากวันที่เติมสารตั้งต้น (day 0) มาสกัดด้วย ethyl acetate ครั้งละ 500 μL จำนวน 2 รอบ ระเหยแห้ง ethyl acetate fraction ที่ได้ เติม mobile phase 2 mL และเจือจาง 10 เท่า ด้วย mobile phase แล้วนำไปวิเคราะห์ปริมาณ isoeugenol และ vanillin ด้วยเทคนิค HPLC

Rx1	Cell suspension	1 mL
	Isoeugenol	0.25, 0.5, 0.75, 1 g
	Cultivation medium to	50 mL

<u>การทดลอง 2</u> ผลของปริมาณ DMSO ต่อการไบโอทรานส์ฟอร์เมชัน isoeugenol โดยจุลินทรีย์เพื่อผลิต vanillin (Yamada et al., 2007)

(1) เติม cell suspension จาก stock culture 1 mL (1×10^5 cell/mL) ลงใน 250-mL Erlenmeyer flask ที่บรรจุ cultivation medium ปริมาตร 38 mL เขย่าด้วยความเร็วรอบ 220 rpm อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

(2) เติม isoeugenol 20 g/L (1 g) ร่วมกับ dimethyl sulfoxide (DMSO) ในอัตราส่วน isoeugenol : DMSO เท่ากับ 1:2, 1:4, 1:6, 1:8 และ 1:10 หรือเติม DMSO 2, 4, 6, 8 และ 10 mL ตามลำดับ ปรับปริมาตรให้ครบ 50 mL ด้วย sterile culture medium เขย่า flask ด้วยความเร็วรอบ 220 rpm ณ อุณหภูมิห้อง ด้วย orbital shaker

(3) เก็บตัวอย่างครั้งละ 500 μL ในวันที่ 1 - 15 (day 1- day 15) นับจากวันที่เติมสารตั้งต้น (day 0) มาสกัดด้วย ethyl acetate ครั้งละ 500 μL จำนวน 2 รอบ ระเหยแห้ง ethyl acetate fractionที่ได้ เติม mobile phase 2 mL และเจือจาง 10 เท่า ด้วย mobile phase แล้วนำไปวิเคราะห์ปริมาณ isoeugenol และ vanillin ด้วยเทคนิค HPLC

Rx 2	Cell suspension	1 mL
	Isoeugenol	1 g
	DMSO	2, 4, 6, 8, 10 mL
	Cultivation medium to	50 mL

<u>การทดลอง 3</u> ผลของ amberlite ต่อการไบโอทรานส์ฟอร์เมชัน isoeugenol โดยจุลินทรีย์เพื่อผลิต vanillin (Shimoni et al., 2000; Zhao et al., 2006)

<u>การทดลอง 3.1</u> ประสิทธิภาพของ amberlite ในการดูดซับและปลดปล่อย isoeugenol และ vanillin

(1) เติม isoeugenol และ/หรือ vanillin ร่วมกับ amberlite ปริมาณ 0, 5, 8, 10, 12, 15% (wet w/v) ใน 250-mL Erlenmeyer flask โดยมีปริมาตรสุดท้าย 50 mL เขย่า flask ด้วยความเร็วรอบ 220 rpm อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

	Rx3	Rx4	Rx5
Isoeugenol (20 g/L)	1 g	1 g	-
Vanillin (20 g/L)	1 g	-	1 g
Cultivation medium to	50 mL	50 mL	50 mL

<u>หมายเหตุ</u> : ให้แช่ amberlite ใน methanol เพื่อกำจัด impurity และล้างด้วย distilled water 3-5 ครั้ง ก่อนใช้

(2) เก็บตัวอย่าง culture medium 500 μL มาสกัดด้วย ethyl acetate ครั้งละ 500 μL จำนวน 2 รอบ ระเหยแห้ง ethyl acetate fractionที่ได้ เติม mobile phase 2 mL และเจือจาง 10 เท่า ด้วย mobile phase แล้วนำไปวิเคราะห์ปริมาณ isoeugenol และ vanillin ด้วยเทคนิค HPLC

(3) แยก amberlite จาก culture medium โดยการกรอง แล้วเติม ethyl acetate ลงใน amberlite ในอัตราส่วน amberlite : ethyl acetate เท่ากับ 1 : 2 (w/v) เขย่า flask ด้วยความเร็วรอบ 220 rpm อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

(4) นำ ethyl acetate fractionที่ได้จาก (3) มาระเหยแห้ง เติม mobile phase 2 mL เจือจาง 10 เท่า ด้วย mobile phase แล้วนำไปวิเคราะห์ปริมาณ isoeugenol และ vanillin ด้วยเทคนิค HPLC

<u>การทดลอง 3.2</u> ผลของ n-hexane/methanol ในการชะล้าง isoeugenol และ vanillin จาก amberlite

(1) เติม isoeugenol 20 g/L (1 g) และ vanillin 20g/L (1 g) และ amberlite ปริมาณ 15% (wet w/v) (7.5 g) ใน 250-mL Erlenmeyer flask ที่บรรจุ cultivation medium ปริมาตรสุดท้าย 50 mL เขย่า flask ด้วยความเร็วรอบ 220 rpm อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน

Rx 6	Isoeugenol	1 g
	Vanillin	1 g
	Amberlite	7.5 g (15% wet wt)
	Cultivation medium to	50 mL

(2) เก็บตัวอย่าง culture medium 500 μL มาสกัดด้วย ethyl acetate 500 μL 2 ครั้ง ระเหยแห้ง ethyl acetate fractionที่ได้ เติม mobile phase 2 mL และเจือจาง 10 เท่า ด้วย mobile phase แล้วนำไปวิเคราะห์ปริมาณ isoeugenol และ vanillin ด้วยเทคนิค HPLC

(3) เติม n-hexane ใน culture medium สัดส่วน culture medium : hexane เท่ากับ 1:3 (150 mL) เขย่า flask ด้วยความเร็วรอบ 220 rpm ณ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นกรองแยก amberlite ออก

(4) แบ่ง hexane fraction 50 mL ไประเหยแห้งและเจือจาง 100 เท่าด้วย mobile phase แล้วนำไปวิเคราะห์ปริมาณ free isoeugenol + desorpted isoeugenol และ free vanillin + desorpted vanillin ด้วยเทคนิค HPLC *(isoeugenol rich fraction)*

(5) เติม methanol 150 mL ลงใน amberlite (250 mL-Erlenmeyer flask) เขย่า flask ด้วยความเร็วรอบ 220 rpm ณ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นกรองแยก amberlite ออก และแบ่ง methanol fraction 50 mL ไประเหยแห้งและเจือจาง 100 เท่าด้วย mobile phase แล้วนำไปวิเคราะห์ปริมาณ desorpted isoeugenol และ desorpted vanillin ด้วยเทคนิค HPLC *(vanillin rich fraction)*

<u>การทดลอง 3.3</u> ผลของ ethyl acetate/methanol ในการชะล้าง isoeugenol และ vanillin จาก amberlite

(1) เติม isoeugenol และ vanillin 10 g/L (0.50 g) ร่วมกับ amberlite 15% (wet w/v) (7.5 g) ใน 250-mL Erlenmeyer flask ที่บรรจุ cultivation medium ปริมาตรสุดท้าย 50 mL เขย่า flask ด้วยความเร็วรอบ 220 rpm อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน

Rx 7	Isoeugenol	0.50 g
	Vanillin	0.50 g
	Amberlite	7.5 g (15% wet wt)
	Cultivation medium to	50 mL

(2) เก็บตัวอย่าง culture medium 500 μL มาสกัดด้วย ethyl acetate ครั้งละ 500 μL จำนวน 2 รอบ ระเหยแห้ง ethyl acetate fraction ที่ได้ เติม mobile phase 2 mL และเจือจาง 10 เท่า ด้วย mobile phase แล้วนำไปวิเคราะห์ปริมาณ isoeugenol และ vanillin ด้วยเทคนิค HPLC *(free isoeugenol rich fraction)*

นำส่วน aqueous fraction (ตัวอย่างที่เหลือจากการสกัดในข้อ (2)) ไประเหยแห้ง เติม mobile phase 2 mL และเจือจาง 10 เท่า ด้วย mobile phase แล้วนำไปวิเคราะห์ปริมาณ isoeugenol และ vanillin ด้วยเทคนิค HPLC *(free vanillin rich fraction)*

(3) เติม ethyl acetate ใน culture medium สัดส่วน culture medium : ethyl acetate เท่ากับ 1:3 (150 mL) เขย่า flask ด้วยความเร็วรอบ 220 rpm ณ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้น กรองแยก amberlite ออก และแบ่ง ethyl acetate fraction 50 mL ไประเหยแห้งและเจือจาง 100 เท่า ด้วย mobile phase แล้วนำไปวิเคราะห์ปริมาณ free isoeugenol + desorpted isoeugenol และ free vanillin + desorpted vanillin ด้วยเทคนิค HPLC *(isoeugenol rich fraction)*

(4) เติม methanol 150 mL ลงใน amberlite ใน 250 mL-Erlenmeyer flask เขย่า flask เติม methanol 150 mL ลงใน amberlite (250 mL-Erlenmeyer flask) เขย่า flask ด้วยความเร็วรอบ 220 rpm ณ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นกรองแยก amberlite ออก และแบ่ง methanol fraction 50 mL ไประเหยแห้งและเจือจาง 100 เท่าด้วย mobile phase แล้วนำไปวิเคราะห์ปริมาณ desorpted isoeugenol และ desorpted vanillin ด้วยเทคนิค HPLC *(vanillin rich fraction)*

<u>การทดลอง 3.4</u> ผลของปริมาณ amberlite ต่อการไบโอทรานส์ฟอร์เมชัน isoeugenol

(1) เติม cell suspension จาก stock culture 1 mL (1×10^5 cell/mL) ลงใน 250-mL Erlenmeyer flask ที่บรรจุ cultivation n medium ปริมาตร 45 mL เขย่า flask ด้วยความเร็วรอบ 220 rpm อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

(2) เติม isoeugenol ตามผลการทดลอง 1 (0.25 g) และ amberlite 7.5, 15, 30% (wet w/v) เทียบเท่ากับอัตราส่วน isoeugenol : amberlite เท่ากับ 1:15 (amberlite 3.75 g) , 1:30 (amberlite 7.5 g) และ 1:60 (amberlite 15 g) ลงใน sterile culture medium ปริมาตรรวม 50 mL เขย่า flask ด้วย ความเร็วรอบ 220 rpm อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 วัน (อ้างอิงจากผลการทดลอง 1)

Rx 8	Isoeugenol	0.25 g
	Amberlite	3.75, 7.5, 15 g
	Cultivation medium to	50 mL

(3) วิเคราะห์ปริมาณ free isoeugenol และ free vanillin ตลอดจน adsorpted isoeugenol และ adsorpted vanillin ใน culture medium ด้วยเทคนิค HPLC เช่นเดียวกับ การทดลอง 3.3

<u>การทดลอง 4</u> ผลร่วมของปริมาณ isoeugenol และ DMSO ต่อการผลิต vanillin ในการไบโอทรานส์ฟอร์เมชัน isoeugenol

(1) เติม cell suspension จาก stock culture 1 mL (1×10^5 cell/mL) ลงใน 250-mL Erlenmeyer flask ที่บรรจุ cultivation medium ปริมาตร 45 mL เขย่า flask ด้วยความเร็วรอบ 220 rpm อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

(2) เติม isoeugenol ตามผลการทดลอง 1, DMSO ตามผลการทดลอง 2 และ amberlite ตามผลการทดลอง 4 ลงใน cultivation medium ปริมาตรรวม 50 mL เขย่า flask ด้วยความเร็วรอบ 220 rpm อุณหภูมิห้อง

		isoeugenol : DMSO : amberlite	
-	*B. sphaericus*	① 250 mg : 0.5 mL : 0 g	ทดสอบ
		② 250 mg : 0.5 mL : 15 g	ไม่ทดสอบ
-	*Strep. peucetius*	③ 250 mg : 1 mL : 0 g	ทดสอบ
		④ 250 mg : 1 mL : 15 g	ไม่ทดสอบ

(3) เก็บตัวอย่างในวันที่ 10, 12, 15 มาวิเคราะห์ปริมาณ isoeugenol และ vanillin ด้วยเทคนิค HPLC โดย ①, ③ ใช้เทคนิคการสกัดของ การสกัดของการทดลอง 1 และ 2 ②, ④ ใช้เทคนิคการสกัดของ การทดลอง 3.3

3.4.2 การวิเคราะห์ปริมาณ isoeugenol และ vanillin ด้วยเทคนิค HPLC

<u>HPLC condition</u>

Column:	Lichrosphere 100 RP-18 column (250 x4 mm i.d., 5 μ° particle size)
Mobile phase:	methanol : 0.01% acetic acid aqueous solution (60 : 40)
Flow rate:	1 mL/min
UV-detector	270 nm

3.5 การวิเคราะห์ข้อมูล

เก็บข้อมูลสามซ้ำ และวิเคราะห์ข้อมูลเชิงสถิติด้วย One-way ANOVA ร่วมกับ pair *t*-test

3.6 สถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล

หน่วยวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพเภสัชกรรม (Pharmaceutical Biotechnology Research Unit, PBRU) ห้อง ภ. 4305 คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร อ. เมือง จ. พิษณุโลก

3.7 ขอบเขตของการวิจัย

(1) ใช้ *Bacillus sphearicus* ATCC 13805 เป็นจุลินทรีย์ต้นแบบ และชนิดของจุลินทรีย์อาจเปลี่ยนแปลงตามความเหมาะสม

(2) ใช้ Amberlite XAD-2 เป็น adsorbent resin ต้นแบบ และชนิดของ adsorbent resin อาจเปลี่ยนแปลงตามความเหมาะสม

(3) ใช้ isoeugenol เป็นสารตั้งต้น และกำหนดสารผลิตภัณฑ์หลักในการวิเคราะห์เป็น vanillin

(4) ใช้เทคนิค HPLC สำหรับการวิเคราะห์สารผลิตภัณฑ์

(5) ไม่รวมถึงการวิเคราะห์ metabolic pathway ของการเกิดสารผลิตภัณฑ์

บทที่ 4
รายงานผลการวิจัย

<u>การทดลอง 1</u> ผลของปริมาณ isoeugenol ต่อการไบโอทรานส์ฟอร์เมชัน isoeugenol โดยจุลินทรีย์เพื่อผลิต vanillin

จากการศึกษาผลของ isoeugenol ปริมาณ 5, 10, 15 และ 20 g/L ต่อการไบโอทรานส์ฟอร์-เมชัน isoeugenol โดย *B. sphaericus* และ *Strep. peucetius* พบว่า isoeugenol 5, 10 และ 15 g/L มีผลให้การผลิต vanillin สูงสุดในวันที่ 10 ของการทดลอง โดยมีค่าเท่ากับ 1.68, 2.77 และ 3.20 g/L สำหรับ *B. sphaericus* และ 2.21, 3.43 และ 4.34 g/L สำหรับ *Strep. peucetius* ตามลำดับ จากนั้นปริมาณ vanillin จะลดลงตามเวลา

เมื่อเติม isoeugenol เพิ่มขึ้นเป็น 20 g/L พบว่าสำหรับ *B. sphaericus* vanillin จะเกิดขึ้นมากกว่าเมื่อใช้ isoeugenol 5, 10 และ 15 g/L โดยปริมาณ vanillin สูงสุดที่เกิดขึ้นเท่ากับ 3.54 (วันที่ 10) ส่วน *Strep. peucetius* ปริมาณ vanillin สูงสุดที่เกิดขึ้นเท่ากับ 3.44 (วันที่ 11) g/L ซึ่งมีปริมาณลดลงเมื่อเทียบกับการใช้ isoeugenol 15 g/L เป็นที่น่าสังเกตว่าจากการคำนวณ %conversion จากอัตราส่วนระหว่าง mMolar ของ vanillin ที่เกิดขึ้นและ isoeugenol เริ่มต้น พบว่าการใช้ isoeugenol ปริมาณต่ำคือ 5 g/L จะให้ค่า %conversion สูงสุด เท่ากับ 36.2 และ 47.7 สำหรับ *B. sphaericus* และ *Strep. peucetius* ตามลำดับ ทั้งนี้เนื่องจากข้อจำกัดด้านความสามารถในการละลายของ isoeugenol จึงต้องพิจารณาปัจจัยร่วมอื่นที่มีผลต่อการช่วยละลายของ isoeugenol เช่นผลของการเติม DMSO ประกอบกัน

ผลการทดลองแสดงดังตาราง 4-1, 4-2 และ รูป 4-1 ถึง 4-3 และตัวอย่าง HPLC-chromatogram แสดงตำแหน่งการเกิด peak ของ isoeugenol และ vanillin แสดงดังรูป 4-4

ตาราง 4-1 ผลของปริมาณ isoeugenol ต่อการไบโอทรานส์ฟอร์เมชัน isoeugenol เพื่อผลิต vanillin โดย *B. sphaericus* และ *Strep. peucetius*

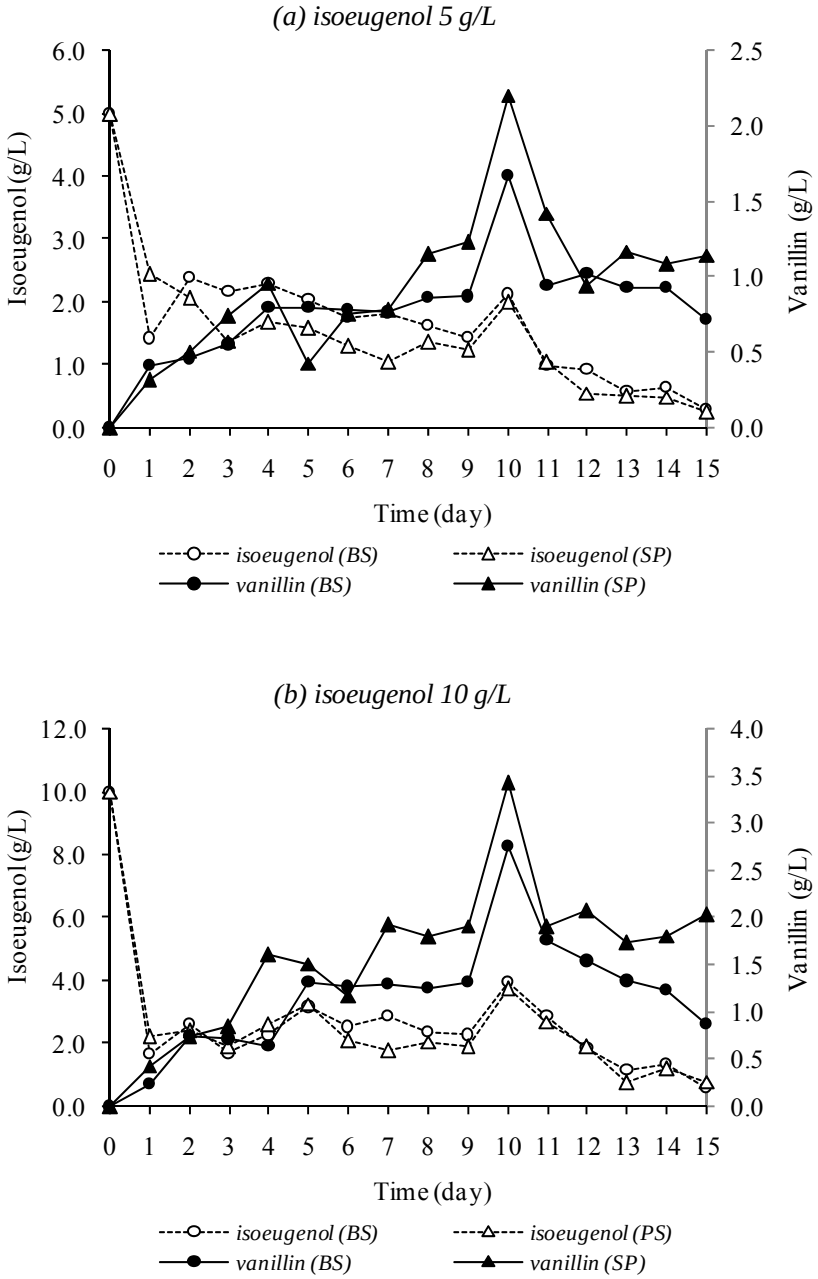
Isoeugenol		*B. sphaericus*		*Strep. peucetius*	
เริ่มต้น	วันที่	isoeugenol (g/L)	vanillin (g/L)	isoeugenol (g/L)	vanillin (g/L)
5 g/L	1	1.43 ± 0.11	0.42 ± 0.08	2.45 ± 0.61	0.32 ± 0.00
	2	2.40 ± 0.07	0.47 ± 0.02	2.07 ± 0.08	0.51 ± 0.03
	3	2.19 ± 0.07	0.56 ± 0.04	1.39 ± 0.25	0.74 ± 0.05
	4	2.31 ± 0.14	0.80 ± 0.03	1.68 ± 0.24	0.96 ± 0.04
	5	2.05 ± 0.48	0.80 ± 0.09	1.60 ± 0.18	0.43 ± 0.01
	6	1.76 ± 0.14	0.79 ± 0.10	1.31 ± 0.45	0.76 ± 0.05
	7	1.83 ± 0.05	0.78 ± 0.03	1.07 ± 0.47	0.78 ± 0.20
	8	1.64 ± 0.07	0.87 ± 0.01	1.38 ± 0.06	1.16 ± 0.05
	9	1.46 ± 0.08	0.88 ± 0.03	1.25 ± 0.07	1.23 ± 0.02
	10	2.14 ± 0.14	1.68 ± 0.09	2.01 ± 0.12	2.21 ± 0.12
	11	1.00 ± 0.05	0.95 ± 0.04	1.05 ± 0.08	1.43 ± 0.03
	12	0.93 ± 0.04	1.02 ± 0.05	0.57 ± 0.07	0.94 ± 0.02
	13	0.60 ± 0.00	0.94 ± 0.03	0.52 ± 0.02	1.18 ± 0.04
	14	0.66 ± 0.01	0.93 ± 0.01	0.51 ± 0.07	1.09 ± 0.12
	15	0.31 ± 0.03	0.72 ± 0.02	0.26 ± 0.02	1.15 ± 0.05
10 g/L	1	1.66 ± 0.22	0.25 ± 0.03	2.23 ± 0.46	0.43 ± 0.13
	2	2.61 ± 0.38	0.76 ± 0.06	2.43 ± 0.12	0.75 ± 0.05
	3	1.70 ± 0.38	0.72 ± 0.11	1.91 ± 0.45	0.84 ± 0.11
	4	2.27 ± 0.48	0.64 ± 0.45	2.61 ± 0.18	1.61 ± 0.07
	5	3.17 ± 0.59	1.32 ± 0.21	3.27 ± 0.25	1.51 ± 0.10
	6	2.53 ± 0.12	1.27 ± 0.11	2.10 ± 0.21	1.17 ± 0.09
	7	2.87 ± 0.08	1.31 ± 0.01	1.76 ± 0.21	1.92 ± 0.19
	8	2.37 ± 0.02	1.25 ± 0.08	2.07 ± 0.11	1.80 ± 0.15
	9	2.29 ± 0.14	1.33 ± 0.05	1.89 ± 0.21	1.92 ± 0.10
	10	3.97 ± 0.70	2.77 ± 0.07	3.77 ± 0.21	3.43 ± 0.09
	11	2.87 ± 0.13	1.76 ± 0.09	2.70 ± 0.18	1.91 ± 0.16
	12	1.85 ± 0.07	1.54 ± 0.06	1.93 ± 0.19	2.08 ± 0.08
	13	1.17 ± 0.15	1.33 ± 0.04	0.75 ± 0.37	1.73 ± 0.09
	14	1.34 ± 0.10	1.24 ± 0.04	1.21 ± 0.10	1.81 ± 0.05
	15	0.58 ± 0.04	0.88 ± 0.06	0.81 ± 0.07	2.03 ± 0.00

หมายเหตุ: Mean ± SE (n = 3)

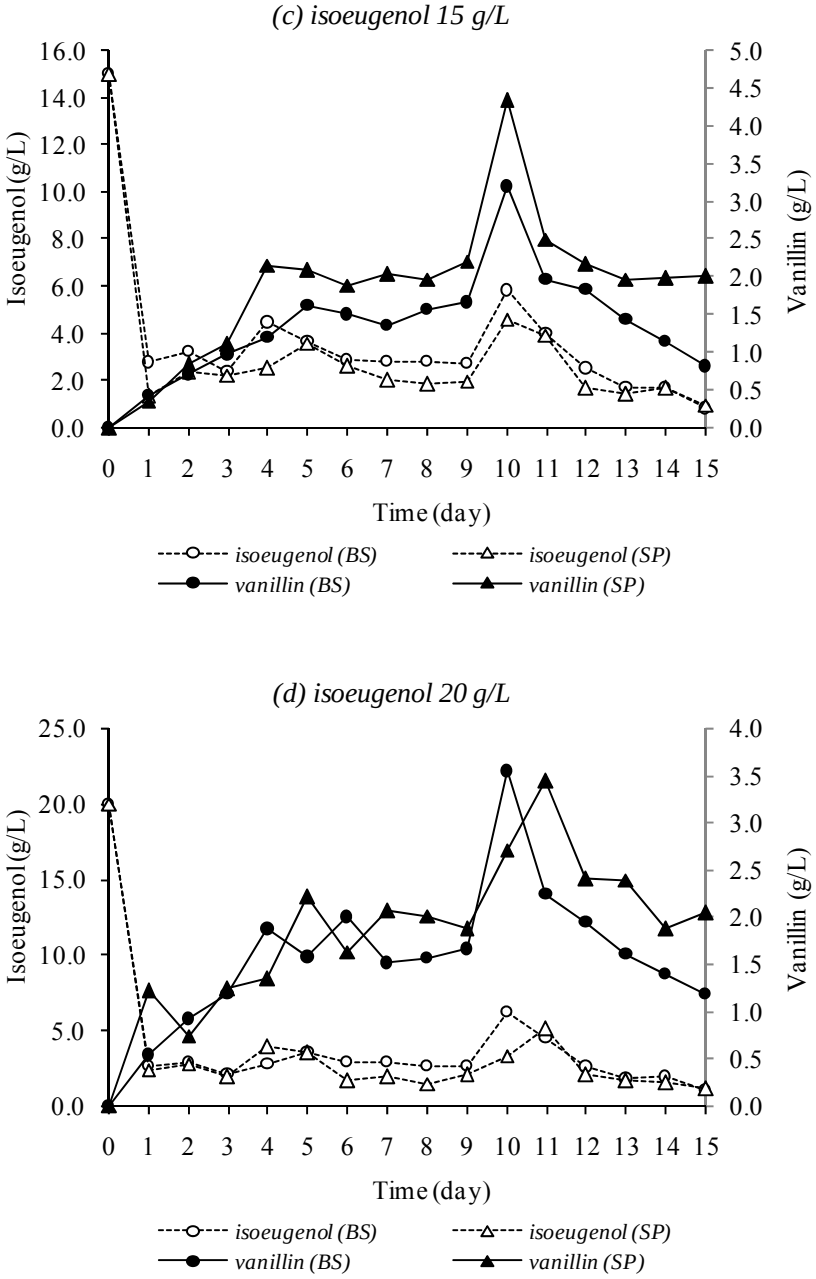
ตาราง 4-1 ผลของปริมาณ isoeugenol ต่อการไบโอทรานส์ฟอร์เมชัน isoeugenol เพื่อผลิต vanillin โดย *B. sphaericus* และ *Strep. peucetius* (ต่อ)

Isoeugenol		*B. sphaericus*		*Strep. peucetius*	
เริ่มต้น	วันที่	isoeugenol (g/L)	vanillin (g/L)	isoeugenol (g/L)	vanillin (g/L)
15 g/L	1	2.80 ± 0.14	0.44 ± 0.07	1.36 ± 0.58	0.36 ± 0.10
	2	3.28 ± 0.26	0.72 ± 0.11	2.40 ± 0.22	0.85 ± 0.07
	3	2.43 ± 0.15	0.98 ± 0.00	2.25 ± 0.18	1.12 ± 0.16
	4	4.48 ± 0.47	1.20 ± 0.17	2.56 ± 0.85	2.16 ± 0.25
	5	3.66 ± 0.49	1.63 ± 0.07	3.61 ± 0.20	2.10 ± 0.13
	6	2.88 ± 0.10	1.51 ± 0.07	2.62 ± 0.02	1.90 ± 0.09
	7	2.81 ± 0.04	1.36 ± 0.01	2.06 ± 0.10	2.04 ± 0.13
	8	2.81 ± 0.06	1.58 ± 0.03	1.85 ± 0.25	1.97 ± 0.26
	9	2.76 ± 0.09	1.67 ± 0.06	2.01 ± 0.08	2.22 ± 0.02
	10	5.83 ± 0.12	3.20 ± 0.01	4.63 ± 0.37	4.34 ± 0.45
	11	4.01 ± 0.23	1.97 ± 0.04	3.96 ± 0.22	2.51 ± 0.06
	12	2.53 ± 0.19	1.85 ± 0.13	1.70 ± 0.24	2.17 ± 0.27
	13	1.73 ± 0.10	1.44 ± 0.08	1.47 ± 0.14	1.98 ± 0.16
	14	1.73 ± 0.02	1.15 ± 0.06	1.71 ± 0.23	1.98 ± 0.15
	15	0.84 ± 0.03	0.82 ± 0.06	0.99 ± 0.14	2.01 ± 0.13
20 g/L	1	2.65 ± 0.03	0.54 ± 0.09	2.42 ± 0.14	1.22 ± 0.05
	2	2.87 ± 0.17	0.92 ± 0.08	2.82 ± 0.10	0.75 ± 0.03
	3	2.11 ± 0.15	1.19 ± 0.16	1.96 ± 0.36	1.24 ± 0.07
	4	2.80 ± 0.14	1.88 ± 0.06	3.93 ± 0.83	1.34 ± 0.04
	5	3.55 ± 0.42	1.58 ± 0.20	3.55 ± 0.69	2.22 ± 0.20
	6	2.92 ± 0.32	2.00 ± 0.54	1.68 ± 0.68	1.64 ± 0.21
	7	2.90 ± 0.05	1.52 ± 0.05	1.97 ± 0.27	2.07 ± 0.00
	8	2.65 ± 0.04	1.57 ± 0.02	1.50 ± 0.72	2.02 ± 0.24
	9	2.66 ± 0.10	1.66 ± 0.06	2.08 ± 0.08	1.88 ± 0.24
	10	6.21 ± 0.21	3.54 ± 0.17	3.33 ± 1.67	2.72 ± 1.37
	11	4.51 ± 0.20	2.24 ± 0.06	5.13 ± 0.80	3.44 ± 0.79
	12	2.60 ± 0.12	1.94 ± 0.11	2.05 ± 0.08	2.41 ± 0.05
	13	1.81 ± 0.08	1.61 ± 0.10	1.67 ± 0.30	2.40 ± 0.44
	14	1.94 ± 0.12	1.39 ± 0.13	1.57 ± 0.10	1.88 ± 0.13
	15	1.06 ± 0.09	1.19 ± 0.14	1.19 ± 0.12	2.04 ± 0.19

หมายเหตุ: Mean ± SE (n = 3)

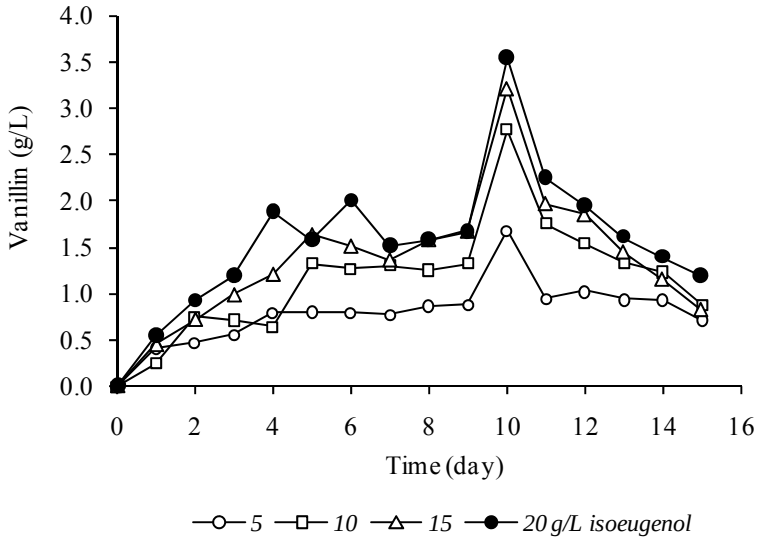


รูป 4-1 การเปลี่ยนแปลงปริมาณ isoeugenol และ vanillin ที่ได้จากการศึกษาผลของปริมาณ isoeugenol 5 (a), 10 (b), 15 (c) และ 20 (d) g/L ต่อการ ไบโอทรานส์ฟอร์เมชัน isoeugenol โดย *B. sphaericus* (BS) และ *Strep. peucetius* (SP)

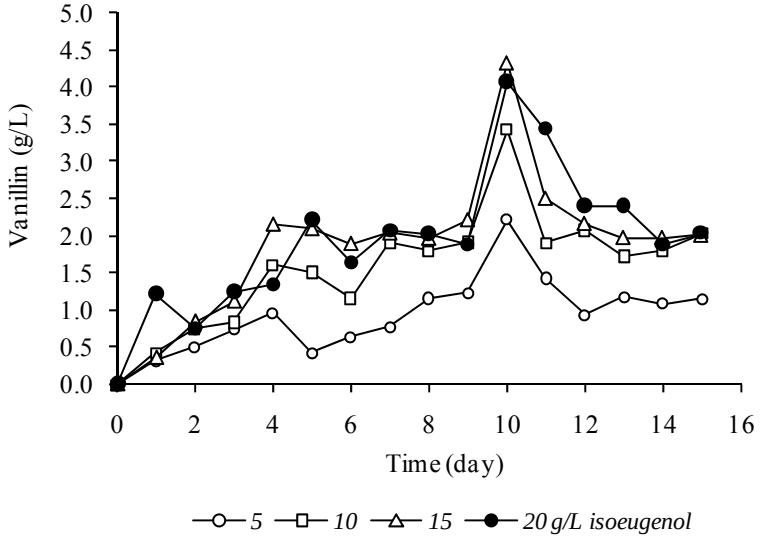


รูป 4-1 การเปลี่ยนแปลงปริมาณ isoeugenol และ vanillin ที่ได้จากการศึกษาผลของปริมาณ isoeugenol 5 (a), 10 (b), 15 (c) และ 20 (d) g/L ต่อการ ไบโอทรานส์ฟอร์เมชัน isoeugenol โดย *B. sphaericus* (BS) และ *Strep. peucetius* (SP) (ต่อ)

(a) B. sphaericus



(b) Strep. peucetius

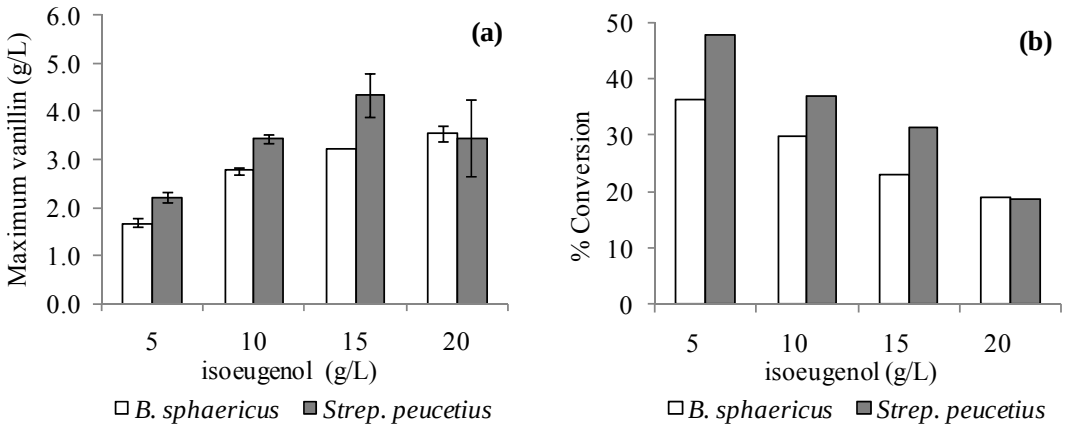


รูป 4-2 การเปลี่ยนแปลงปริมาณ vanillin ณ เวลาต่างๆ จากการศึกษาผลของปริมาณ isoeugenol ต่อการไบโอทรานส์ฟอร์เมชัน isoeugenol โดย (a) *B. sphaericus* และ (b) *Strep. peucetius*

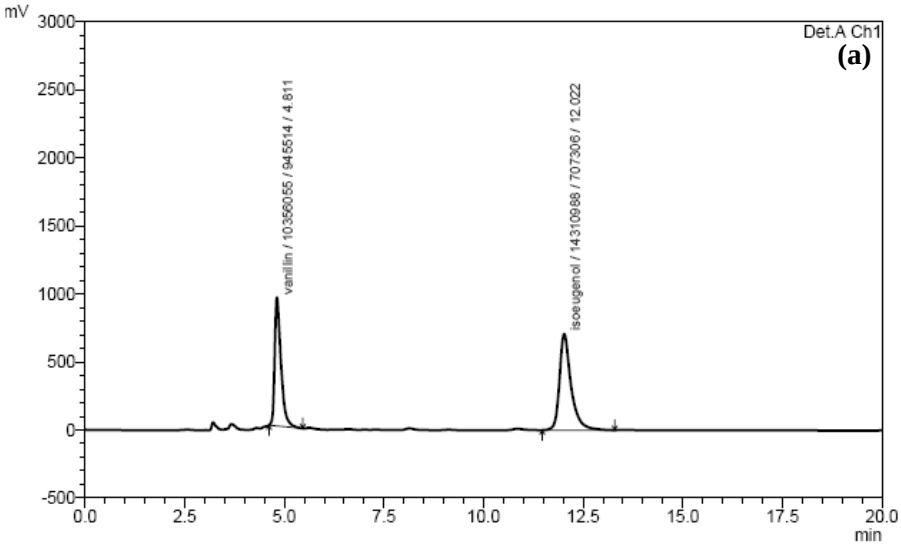
ตาราง 4-2 ปริมาณ vanillin และ %conversion สูงสุดที่ได้จากการศึกษาผลของปริมาณ isoeugenol ต่อการไบโอทรานส์ฟอร์เมชัน isoeugenol โดย *B. sphaericus* และ *Strep. peucetius*

Isoeugenol (g/L)	*B. sphaericus*		*Strep. peucetius*	
	Max. vanillin (g/L) (day)	%conversion	Max. vanillin (g/L) (day)	%conversion
5	1.68 ± 0.09 (day 10)	36.19	2.21 ± 0.12 (day 10)	47.67
10	2.77 ± 0.07 (day 10)	29.85	3.43 ± 0.09 (day 10)	37.01
15	3.20 ± 0.01 (day 10)	23.06	4.34 ± 0.45 (day 10)	31.23
20	3.54 ± 0.17 (day 10)	19.13	3.44 ± 0.79 (day 11)	18.58

หมายเหตุ: Mean±SE (n = 3), %conversion = $\left(\frac{vanillin(mM)}{isoeugenol(mM)} \times 100\right)$



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

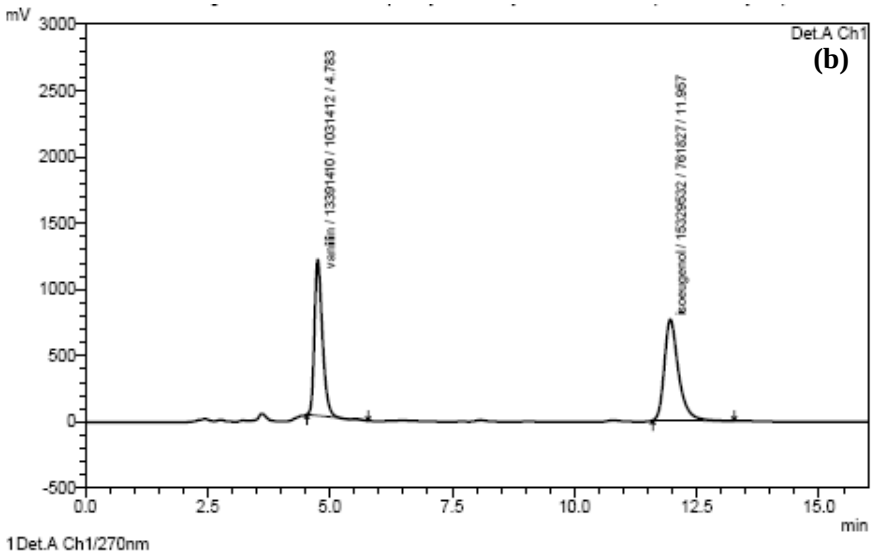


1Det.A Ch1/270nm

<Results>

Detector A

ID#	Name	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %	Mark
1	vanillin	4.811	10356055	945514	41.983	57.206	
2	isoeugenol	12.022	14310988	707306	58.017	42.794	



1Det.A Ch1/270nm

<Results>

Detector A

ID#	Name	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %	Mark
1	vanillin	4.783	13391410	1031412	46.626	57.517	
2	isoeugenol	11.957	15329532	761827	53.374	42.483	

รูป 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*

<u>การทดลอง 2</u> ผลของปริมาณ DMSO ต่อการไบโอทรานส์ฟอร์เมชัน isoeugenol

จากการศึกษาผลของปริมาณ DMSO ต่อการไบโอทรานส์ฟอร์เมชันของ isoeugenol ปริมาณ 20 g/L โดย *B. sphaericus* และ *Strep. peucetius* (ปริมาณเริ่มต้น 1×10^5 cell/mL) ใช้อัตราส่วน isoeugenol : DMSO เท่ากับ 1:2, 1:4, 1:6, 1:8 และ 1:10 ใน cultivation medium pH 7.5 ปริมาตรรวม 50 mL กำหนดสภาวะการเพาะเลี้ยง ณ อุณหภูมิห้อง (30 $\pm$2 °C) เขย่าด้วยเครื่องเขย่าแบบหมุนวน ความเร็วรอบ 220 rpm เก็บตัวอย่าง medium ครั้งละ 500 µL ตั้งแต่วันที่ 1 -16 นับตั้งแต่การเติม isoeugenol

เมื่อสกัด medium ด้วย ethyl acetate และวิเคราะห์ด้วย HPLC เทียบกับ standard curve ได้ผลการทดลองดังนี้

➢➢ <u>เมื่อทดสอบด้วย ***B. sphaericus***</u>

ในระบบที่ไม่เติม DMSO วิเคราะห์สารตั้งต้น isoeugenol ใน medium ได้เพิ่มขึ้นตามเวลาจนมีปริมาณสูงสุด 9.07 g/L ในวันที่ 5 จากนั้นจะมีปริมาณลดลงเรื่อยๆ เมื่อสิ้นสุดระยะเวลาเพาะเลี้ยง (16 วัน) ยังมี isoeugenol เหลือใน medium 2.90 g/L และในขณะที่ isoeugenol มีปริมาณลดลง วิเคราะห์พบปริมาณ vanillin ที่เพิ่มขึ้นตามเวลา ซึ่งในวันที่ 12 ของการเพาะเลี้ยง vanillin ผลิตได้สูงสุดเท่ากับ 2.82 g/L คิดเป็น % conversion เท่ากับ 15.37 จากนั้นจึงลดลงเป็นลำดับ

ในระบบที่เติม DMSO ในอัตราส่วน isoeugenol : DMSO เท่ากับ 1:2 วิเคราะห์ปริมาณ isoeugenol ใน medium ในระยะแรกของการทดลองได้มากกว่าเมื่อไม่เติม DMSO และมีปริมาณเพิ่มขึ้นตามเวลา จนวิเคราะห์ได้ปริมาณสูงสุด 9.64 g/L ในวันที่ 10 จากนั้นจึงลดลงเรื่อยๆ เมื่อสิ้นสุดระยะเวลาเพาะเลี้ยง (16 วัน) ยังมี isoeugenol เหลือใน medium 4.63 g/L และในขณะที่ isoeugenol มีปริมาณลดลง วิเคราะห์พบปริมาณ vanillin ที่เพิ่มขึ้นตามเวลา ซึ่งในวันที่ 11 ของการเพาะเลี้ยง vanillin ผลิตได้สูงสุดเท่ากับ 4.18 g/L คิดเป็น % conversion เท่ากับ 22.76 จากนั้นจึงลดลงอย่างรวดเร็ว

ในระบบที่เติม DMSO ในอัตราส่วน isoeugenol : DMSO เท่ากับ 1:4 วิเคราะห์ปริมาณ isoeugenol ใน medium ในระยะแรกของการทดลองได้มากกว่าเมื่อไม่เติม DMSO และมีปริมาณเพิ่มขึ้นตามเวลา จนมีปริมาณสูงสุด 10.32 g/L ในวันที่ 7 จากนั้นจึงลดลงเรื่อยๆ เมื่อสิ้นสุดระยะเวลาเพาะเลี้ยง (16 วัน) ยังมี isoeugenol เหลือใน medium 5.98 g/L ในขณะที่ isoeugenol มีปริมาณลดลง วิเคราะห์พบปริมาณ vanillin เพิ่มขึ้นตามเวลา ซึ่งในวันที่ 11 ของการเพาะเลี้ยง vanillin ผลิตได้สูงสุดเท่ากับ 2.92 g/L คิดเป็น % conversion เท่ากับ 15.89 g/L) จากนั้นจึงลดลงตามลำดับ

ในระบบที่เติม DMSO ในอัตราส่วน isoeugenol : DMSO เท่ากับ 1:6 วิเคราะห์ปริมาณ isoeugenol ใน medium ในระยะแรกของการทดลองได้มากกว่าเมื่อไม่เติม DMSO และเมื่อเติม

DMSO ในอัตราส่วน 1:4 และวิเคราะห์พบใน medium เพิ่มขึ้นตามเวลาจนมีปริมาณสูงสุด 13.54 g/L ในวันที่ 5 จากนั้นจึงลดลงเรื่อยๆ เมื่อสิ้นสุดระยะเวลาเพาะเลี้ยง (16 วัน) ยังมี isoeugenol เหลือใน medium 5.23 g/L และในขณะที่ isoeugenol มีปริมาณลดลงตามเวลา วิเคราะห์พบปริมาณ vanillin เพิ่มขึ้นตามเวลา ซึ่งในวันที่ 13 ของการเพาะเลี้ยง vanillin ผลิตได้สูงสุดเท่ากับ 2.76 g/L คิดเป็น % conversion เท่ากับ 15.03 จากนั้นจึงลดลงตามลำดับ

ในระบบที่เติม DMSO ในอัตราส่วน isoeugenol : DMSO เท่ากับ 1:8 วิเคราะห์ isoeugenol ใน medium ในระยะแรกของการทดลองได้มากกว่าเมื่อไม่เติม DMSO และเมื่อเติม DMSO ในอัตราส่วน 1:4, 1:6 และมีปริมาณเพิ่มขึ้นตามเวลาจนมีปริมาณสูงสุด 14.04 g/L ในวันที่ 5 จากนั้นจึงลดลงเรื่อยๆ เมื่อสิ้นสุดระยะเวลาเพาะเลี้ยง (16 วัน) ยังมี isoeugenol เหลือใน medium 8.50 g/L ในขณะที่ isoeugenol มีปริมาณลดลง วิเคราะห์พบปริมาณ vanillin เพิ่มขึ้นตามเวลา ซึ่งในวันที่ 16 ของการเพาะเลี้ยง vanillin ผลิตได้สูงสุดเท่ากับ 2.66 g/L คิดเป็น % conversion เท่ากับ 14.50 และมีแนวโน้มการเพิ่มขึ้นแต่ไม่ชัดเจนนัก

ในระบบที่เติม DMSO ในอัตราส่วน isoeugenol : DMSO เท่ากับ 1:10 วิเคราะห์ isoeugenol ใน medium ในระยะแรกของการทดลองได้มากกว่าเมื่อไม่เติม DMSO และเมื่อเติม DMSO ในอัตราส่วน 1:4, 1:6, 1:8 และมีปริมาณเพิ่มขึ้นตามเวลาจนมีปริมาณสูงสุด 15.47 g/L ในวันที่ 5 จากนั้นจึงลดลงเรื่อยๆ เมื่อสิ้นสุดระยะเวลาเพาะเลี้ยง (16 วัน) ยังมี isoeugenol เหลือใน medium 9.65 g/L ในขณะที่ isoeugenol มีปริมาณลดลง จะวิเคราะห์พบปริมาณ vanillin เพิ่มขึ้นตามเวลา ซึ่งในวันที่ 15 และ 16 ของการเพาะเลี้ยง vanillin ผลิตได้สูงสุดเท่ากับ 2.47 g/L คิดเป็น % conversion เท่ากับ 13.55

➢➢ <u>เมื่อทดสอบด้วย *Strep. peucetius*</u>

ในระบบที่ไม่เติม DMSO วิเคราะห์ isoeugenol ใน medium ได้เพิ่มขึ้นตามเวลาจนมีปริมาณสูงสุด 8.35 g/L ในวันที่ 8 และลดลงอย่างรวดเร็ว เมื่อสิ้นสุดระยะเวลาเพาะเลี้ยง (16 วัน) ยังมี isoeugenol เหลือใน medium 2.65 g/L และในขณะที่ isoeugenol มีปริมาณลดลง วิเคราะห์พบปริมาณ vanillin เพิ่มขึ้นตามเวลา ซึ่งในวันที่ 10 ของการเพาะเลี้ยง vanillin ผลิตได้สูงสุดเท่ากับ 2.95 g/L คิดเป็น % conversion เท่ากับ 16.05 จากนั้นจึงลดลงอย่างรวดเร็ว

ในระบบที่เติม DMSO ในอัตราส่วน isoeugenol : DMSO เท่ากับ 1:2 วิเคราะห์ isoeugenol ใน medium ระยะแรกของการทดลองได้มากกว่าเมื่อไม่เติม DMSO และมีปริมาณเพิ่มขึ้นตามเวลาจนมีปริมาณสูงสุด 8.17 g/L ในวันที่ 7 จากนั้นจึงลดลงเรื่อยๆ เมื่อสิ้นสุดระยะเวลาเพาะเลี้ยง (16 วัน) ยังมี isoeugenol เหลือใน medium 3.02 g/L และในขณะที่ isoeugenol มีปริมาณลดลง วิเคราะห์พบปริมาณ vanillin เพิ่มขึ้นตามเวลา ซึ่งในวันที่ 15 ของการเพาะเลี้ยง vanillin ผลิตได้สูงสุดเท่ากับ 3.78 g/L คิดเป็น % conversion เท่ากับ 20.57 และมีแนวโน้มลดลงในวันต่อมา

ในระบบที่เติม DMSO ในอัตราส่วน isoeugenol : DMSO เท่ากับ 1:4 วิเคราะห์สารตั้งต้น isoeugenol ใน medium ในระยะแรกได้น้อย แต่มีปริมาณเพิ่มขึ้นตามเวลาจนมีปริมาณสูงสุด 9.30 g/L ในวันที่ 9 จากนั้นจึงลดลงเรื่อยๆ เมื่อสิ้นสุดระยะเวลาเพาะเลี้ยง (16 วัน) ยังมี isoeugenol เหลือใน medium 4.27 g/L ในขณะที่ isoeugenol มีปริมาณลดลง วิเคราะห์พบปริมาณ vanillin เพิ่มขึ้นตามเวลา ซึ่งในวันที่ 15 ของการเพาะเลี้ยง vanillin ผลิตได้สูงสุดเท่ากับ 4.32 g/L คิดเป็น % conversion เท่ากับ 23.50 และมีแนวโน้มลดลงในวันต่อมา

ในระบบที่เติม DMSO ในอัตราส่วน isoeugenol : DMSO เท่ากับ 1:6 วิเคราะห์สารตั้งต้น isoeugenol ใน medium ในระยะแรกได้น้อย และมีปริมาณเพิ่มขึ้นตามเวลาจนมีปริมาณสูงสุด 8.56 g/L ในวันที่ 7 จากนั้นจึงลดลงเรื่อยๆ เมื่อสิ้นสุดระยะเวลาเพาะเลี้ยง (16 วัน) ยังมี isoeugenol เหลือใน medium 4.22 g/L และในขณะที่ isoeugenol มีปริมาณลดลงตามเวลา จะวิเคราะห์พบปริมาณ vanillin เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ซึ่งในวันที่ 16 ของการเพาะเลี้ยง vanillin ผลิตได้สูงสุดเท่ากับ 3.36 g/L คิดเป็น % conversion เท่ากับ 18.28 และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น

ในระบบที่เติม DMSO ในอัตราส่วน isoeugenol : DMSO เท่ากับ 1:8 วิเคราะห์สารตั้งต้น isoeugenol ใน medium ในระยะแรกได้น้อย และมีปริมาณเพิ่มขึ้นตามเวลาจนมีปริมาณสูงสุด 14.04 g/L ในวันที่ 5 จากนั้นจึงลดลงเรื่อยๆ เมื่อสิ้นสุดระยะเวลาเพาะเลี้ยง (16 วัน) ยังมี isoeugenol เหลือใน medium 8.50 g/L ในขณะที่ isoeugenol มีปริมาณลดลง จะวิเคราะห์พบปริมาณ vanillin เพิ่มขึ้นตามเวลา ซึ่งในวันที่ 16 ของการเพาะเลี้ยง vanillin ผลิตได้สูงสุดเท่ากับ 2.66 g/L คิดเป็น % conversion เท่ากับ 14.50

ในระบบที่เติม DMSO ในอัตราส่วน isoeugenol : DMSO เท่ากับ 1:10 วิเคราะห์สารตั้งต้น isoeugenol ใน medium ระยะแรกของการทดลองได้มากกว่าเมื่อไม่เติม DMSO และเมื่อเติม DMSO ในอัตราส่วน 1:4, 1:6, 1:8 และมีปริมาณเพิ่มขึ้นตามเวลาจนมีปริมาณสูงสุด 15.47 g/L ในวันที่ 5 จากนั้นจึงลดลงเรื่อยๆ เมื่อสิ้นสุดระยะเวลาเพาะเลี้ยง (16 วัน) ยังมี isoeugenol เหลือใน medium 9.65 g/L ในขณะที่ isoeugenol มีปริมาณลดลง จะวิเคราะห์พบปริมาณ vanillin เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ตามเวลา ซึ่งในวันที่ 15 และ 16 ของการเพาะเลี้ยง vanillin ผลิตได้สูงสุดเท่ากับ 2.47 g/L คิดเป็น % conversion เท่ากับ 13.55

ผลการทดลองแสดงดังตาราง 4-3 ถึง 4-5 และรูป 4-5 ถึง 4-8 และตัวอย่าง HPLC-chromatogram แสดงตำแหน่งการเกิด peak ของ isoeugenol และ vanillin แสดงดังรูป 4-9

ตาราง 4-3 ผลของปริมาณ DMSO ต่อการไบโอทรานส์ฟอร์เมชัน isoeugenol เพื่อผลิต vanillin โดย *B. sphaericus*

isoeugenol : DMSO	วันที่	isoeugenol (g/L)*	vanillin (g/L)*	%conversion**
0	0	0.74 ±0.164	0.01 ±0.003	0.07
	1	5.53 ±0.545	0.24 ±0.015	1.32
	2	7.29 ±0.595	0.52 ±0.076	2.85
	3	7.43 ±0.109	0.77 ±0.042	4.17
	4	7.85 ±0.519	0.98 ±0.042	5.35
	5	9.07 ±0.991	1.48 ±0.139	8.04
	6	8.01 ±0.307	1.43 ±0.118	7.78
	7	6.98 ±0.534	1.50 ±0.366	8.14
	8	6.97 ±0.131	1.80 ±0.185	9.79
	9	6.97 ±0.583	1.82 ±0.094	9.91
	10	7.11 ±0.299	2.38 ±0.267	12.94
	11	6.52 ±0.585	2.40 ±0.021	13.04
	12	6.49 ±0.617	2.82 ±0.399	15.35
	13	5.84 ±0.349	2.54 ±0.082	13.82
	14	5.48 ±0.667	2.48 ±0.127	13.49
	15	5.51 ±0.145	2.34 ±0.012	12.74
	16	2.90 ±0.231	2.34 ±0.114	12.76
1:2	0	5.40 ±0.585	0.05 ±0.008	0.28
	1	6.78 ±0.198	0.26 ±0.046	1.42
	2	7.83 ±0.681	0.58 ±0.080	3.16
	3	8.73 ±0.102	0.88 ±0.024	4.77
	4	8.97 ±0.477	1.07 ±0.118	5.82
	5	8.90 ±0.218	1.11 ±0.508	6.04
	6	9.08 ±0.473	1.28 ±0.324	6.95
	7	9.12 ±0.373	1.40 ±0.245	7.62
	8	9.49 ±0.596	1.55 ±0.265	8.44
	9	9.44 ±0.151	2.01 ±0.280	10.94
	10	9.64 ±0.584	3.01 ±0.322	16.38
	11	8.33 ±0.022	4.18 ±0.050	22.76
	12	7.76 ±0.425	3.75 ±0.474	20.40
	13	7.19 ±0.387	2.81 ±0.291	15.28
	14	7.13 ±0.069	2.64 ±0.006	14.36
	15	6.10 ±0.502	2.49 ±0.299	13.55
	16	4.63 ±0.428	2.24 ±0.467	12.19

หมายเหตุ: Mean ± SE (n = 3), isoeugenol เริ่มต้น 20 g/L

ตาราง 4-3 ผลของปริมาณ DMSO ต่อการไบโอทรานส์ฟอร์เมชัน isoeugenol เพื่อผลิต vanillin โดย *B. sphaericus* (ต่อ)

isoeugenol : DMSO	วันที่	isoeugenol (g/L)*	vanillin (g/L)*	%conversion**
1:4	0	4.98 ±0.125	0.05 ±0.011	0.25
	1	6.69 ±0.305	0.25 ±0.018	1.39
	2	8.89 ±0.318	0.56 ±0.023	3.05
	3	9.21 ±0.378	0.87 ±0.074	4.72
	4	9.31 ±0.042	1.12 ±0.010	6.11
	5	9.44 ±0.261	1.49 ±0.030	8.12
	6	9.72 ±0.373	1.50 ±0.245	8.16
	7	10.32 ±0.320	1.54 ±0.073	8.38
	8	10.04 ±0.707	1.87 ±0.194	10.19
	9	9.55 ±0.129	1.79 ±0.210	9.75
	10	9.18 ±0.206	1.98 ±0.027	10.75
	11	8.90 ±0.651	2.84 ±0.398	15.43
	12	9.09 ±0.203	2.92 ±0.305	15.89
	13	8.98 ±0.195	2.90 ±0.188	15.80
	14	8.51 ±0.639	2.81 ±0.481	15.29
	15	8.20 ±0.324	2.48 ±0.288	13.52
	16	5.98 ±0.425	2.35 ±0.390	12.79
1:6	0	6.65 ±1.005	0.06 ±0.007	0.32
	1	8.16 ±0.528	0.27 ±0.030	1.46
	2	10.03 ±0.270	0.56 ±0.075	3.03
	3	10.08 ±0.131	0.88 ±0.031	4.79
	4	10.72 ±0.176	1.03 ±0.036	5.60
	5	13.54 ±0.350	1.11 ±0.042	6.02
	6	11.83 ±0.278	1.33 ±0.036	7.23
	7	11.68 ±0.667	1.44 ±0.250	7.83
	8	11.62 ±0.740	1.94 ±0.201	10.57
	9	11.39 ±0.568	2.25 ±0.093	12.24
	10	11.09 ±0.794	2.56 ±0.393	13.93
	11	10.87 ±0.895	2.60 ±0.045	14.14
	12	10.35 ±0.587	2.67 ±0.272	14.53
	13	10.50 ±0.150	2.76 ±0.037	15.03
	14	9.01 ±0.277	2.31 ±0.083	12.55
	15	9.06 ±0.548	2.20 ±0.433	11.96
	16	5.23 ±0.460	2.09 ±0.288	11.36

หมายเหตุ: Mean ± SE (n = 3), isoeugenol เริ่มต้น 20 g/L

ตาราง 4-3 ผลของปริมาณ DMSO ต่อการไบโอทรานส์ฟอร์เมชัน isoeugenol เพื่อผลิต vanillin โดย *B. sphaericus* (ต่อ)

isoeugenol : DMSO	วันที่	isoeugenol (g/L)*	vanillin (g/L)*	%conversion**
1:8	0	7.16 ±0.185	0.18 ±0.015	0.97
	1	8.98 ±0.421	0.27 ±0.049	1.46
	2	10.02 ±0.313	0.49 ±0.048	2.64
	3	10.75 ±0.501	0.78 ±0.114	4.27
	4	11.36 ±0.142	1.04 ±0.021	5.65
	5	14.04 ±1.362	1.26 ±0.035	6.86
	6	13.85 ±1.240	1.25 ±0.321	6.80
	7	12.43 ±0.147	1.31 ±0.034	7.13
	8	12.30 ±0.105	1.36 ±0.005	7.40
	9	12.17 ±0.928	1.47 ±0.205	8.00
	10	12.06 ±1.306	2.38 ±0.250	12.95
	11	11.57 ±0.889	2.42 ±0.302	13.17
	12	11.03 ±1.215	2.47 ±0.161	13.44
	13	10.76 ±0.406	2.35 ±0.334	12.79
	14	10.20 ±1.759	2.40 ±0.390	13.06
	15	8.69 ±0.687	2.43 ±0.182	13.22
	16	8.50 ±0.285	2.66 ±0.123	14.50
1:10	0	9.03 ±0.937	0.06 ±0.013	0.33
	1	10.14 ±0.600	0.29 ±0.086	1.57
	2	10.27 ±0.454	0.46 ±0.043	2.51
	3	11.15 ±0.174	0.80 ±0.051	4.38
	4	11.45 ±0.144	0.88 ±0.026	4.80
	5	15.47 ±0.387	0.87 ±0.049	4.73
	6	15.12 ±0.642	0.87 ±0.102	4.76
	7	13.38 ±0.367	1.03 ±0.042	5.63
	8	12.67 ±0.290	1.32 ±0.125	7.18
	9	12.38 ±1.122	1.39 ±0.292	7.56
	10	12.16 ±1.075	1.62 ±0.692	8.81
	11	12.12 ±0.862	1.62 ±0.213	8.81
	12	11.54 ±0.245	1.60 ±0.066	8.70
	13	11.10 ±0.806	1.63 ±0.089	8.87
	14	10.77 ±1.040	1.77 ±0.346	9.60
	15	10.05 ±0.856	2.49 ±0.642	13.55
	16	9.65 ±0.502	2.37 ±0.442	12.89

หมายเหตุ: Mean ± SE (n = 3), isoeugenol เริ่มต้น 20 g/L

ตาราง 4-4 ผลของปริมาณ DMSO ต่อการไบโอทรานส์ฟอร์เมชัน isoeugenol เพื่อผลิต vanillin โดย *Strep. peucetius*

isoeugenol : DMSO	วันที่	isoeugenol (g/L)*	vanillin (g/L)*	%conversion**
0	0	1.64 ±0.620	0.03 ±0.009	0.17
	1	2.45 ±0.307	0.28 ±0.034	1.50
	2	3.42 ±0.671	0.25 ±0.082	1.37
	3	3.74 ±0.608	0.36 ±0.136	1.96
	4	3.42 ±0.377	0.54 ±0.014	2.94
	5	5.48 ±0.200	0.91 ±0.077	4.96
	6	5.87 ±0.662	1.57 ±0.399	8.54
	7	6.65 ±0.775	2.60 ±0.472	14.15
	8	8.35 ±0.221	2.89 ±0.106	15.73
	9	5.79 ±0.238	2.87 ±0.459	15.62
	10	4.88 ±0.175	2.95 ±0.521	16.05
	11	4.96 ±0.527	2.85 ±0.592	15.51
	12	3.60 ±0.773	2.81 ±0.674	15.29
	13	3.42 ±0.550	1.84 ±0.591	10.01
	14	3.10 ±0.381	1.78 ±0.306	9.68
	15	2.88 ±0.144	1.60 ±0.597	8.71
	16	2.65 ±0.633	1.47 ±0.290	8.00
1:2	0	3.32 ±0.534	0.15 ±0.090	0.82
	1	3.49 ±0.463	0.26 ±0.082	1.41
	2	4.41 ±0.331	0.29 ±0.015	1.58
	3	4.30 ±0.589	0.25 ±0.049	1.36
	4	4.37 ±0.349	0.25 ±0.096	1.36
	5	4.42 ±0.320	0.27 ±0.169	1.47
	6	4.55 ±0.249	0.20 ±0.029	1.09
	7	8.17 ±0.404	0.27 ±0.542	1.47
	8	8.08 ±0.623	0.81 ±0.279	4.41
	9	7.68 ±0.229	1.49 ±0.070	8.11
	10	5.37 ±0.661	1.52 ±0.452	8.27
	11	4.39 ±0.190	1.84 ±0.145	10.01
	12	4.35 ±0.296	1.85 ±0.384	10.07
	13	3.78 ±0.543	2.06 ±0.556	11.21
	14	3.47 ±0.272	2.30 ±0.496	12.51
	15	3.22 ±0.669	3.78 ±0.464	20.57
	16	3.02 ±0.521	3.51 ±0.674	19.10

หมายเหตุ: Mean ± SE (n = 3), isoeugenol เริ่มต้น 20 g/L

ตาราง 4-4 ผลของปริมาณ DMSO ต่อการไบโอทรานส์ฟอร์เมชัน isoeugenol เพื่อผลิต vanillin โดย *Strep. peucetius* (ต่อ)

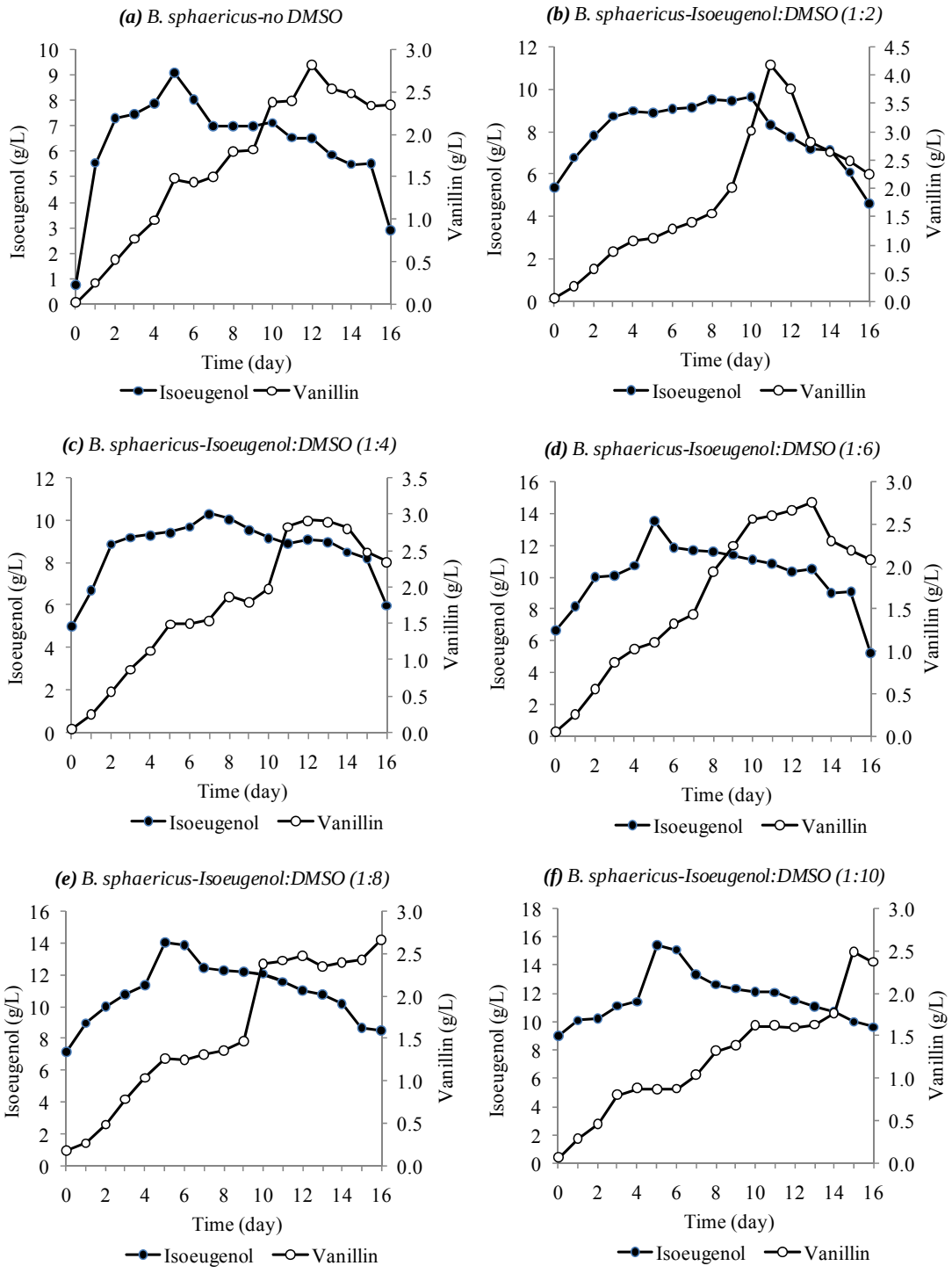
isoeugenol : DMSO	วันที่	isoeugenol (g/L)*	vanillin (g/L)*	%conversion**
1:4	0	2.16 ±0.240	0.12 ±0.008	0.64
	1	2.33 ±0.290	0.33 ±0.006	1.80
	2	2.88 ±0.558	0.44 ±0.052	2.39
	3	3.00 ±0.268	0.47 ±0.175	2.56
	4	5.14 ±0.165	0.48 ±0.109	2.61
	5	5.40 ±0.633	0.50 ±0.130	2.72
	6	5.44 ±0.684	0.53 ±0.100	2.88
	7	6.62 ±0.419	0.66 ±0.175	3.59
	8	6.80 ±0.475	0.96 ±0.457	5.22
	9	9.30 ±0.204	1.43 ±0.034	7.78
	10	8.60 ±0.398	1.87 ±0.098	10.17
	11	8.65 ±0.115	2.20 ±0.088	11.97
	12	7.45 ±0.101	2.32 ±0.317	12.62
	13	7.62 ±0.192	2.43 ±0.609	13.22
	14	6.72 ±0.512	2.91 ±0.439	15.83
	15	6.27 ±0.279	4.32 ±0.895	23.50
	16	4.27 ±0.382	3.77 ±0.512	20.50
1:6	0	2.49 ±0.116	0.13 ±0.000	0.69
	1	2.92 ±0.547	0.36 ±0.047	1.97
	2	3.90 ±0.367	0.54 ±0.127	2.94
	3	4.48 ±0.688	0.55 ±0.063	2.99
	4	4.61 ±0.422	0.60 ±0.235	3.26
	5	7.11 ±0.569	0.62 ±0.082	3.37
	6	7.43 ±0.307	0.64 ±0.043	3.48
	7	8.56 ±0.438	0.60 ±0.052	3.26
	8	7.76 ±0.587	0.64 ±0.086	3.48
	9	7.74 ±0.236	0.59 ±0.039	3.21
	10	6.56 ±0.565	0.88 ±0.093	4.79
	11	5.99 ±0.429	1.54 ±0.260	8.38
	12	4.71 ±0.645	1.72 ±0.102	9.36
	13	4.35 ±0.558	1.76 ±0.671	9.58
	14	4.22 ±0.309	1.85 ±0.672	10.07
	15	4.45 ±0.410	3.08 ±0.462	16.76
	16	4.22 ±0.224	3.36 ±0.374	18.28

หมายเหตุ: Mean ± SE (n = 3), isoeugenol เริ่มต้น 20 g/L

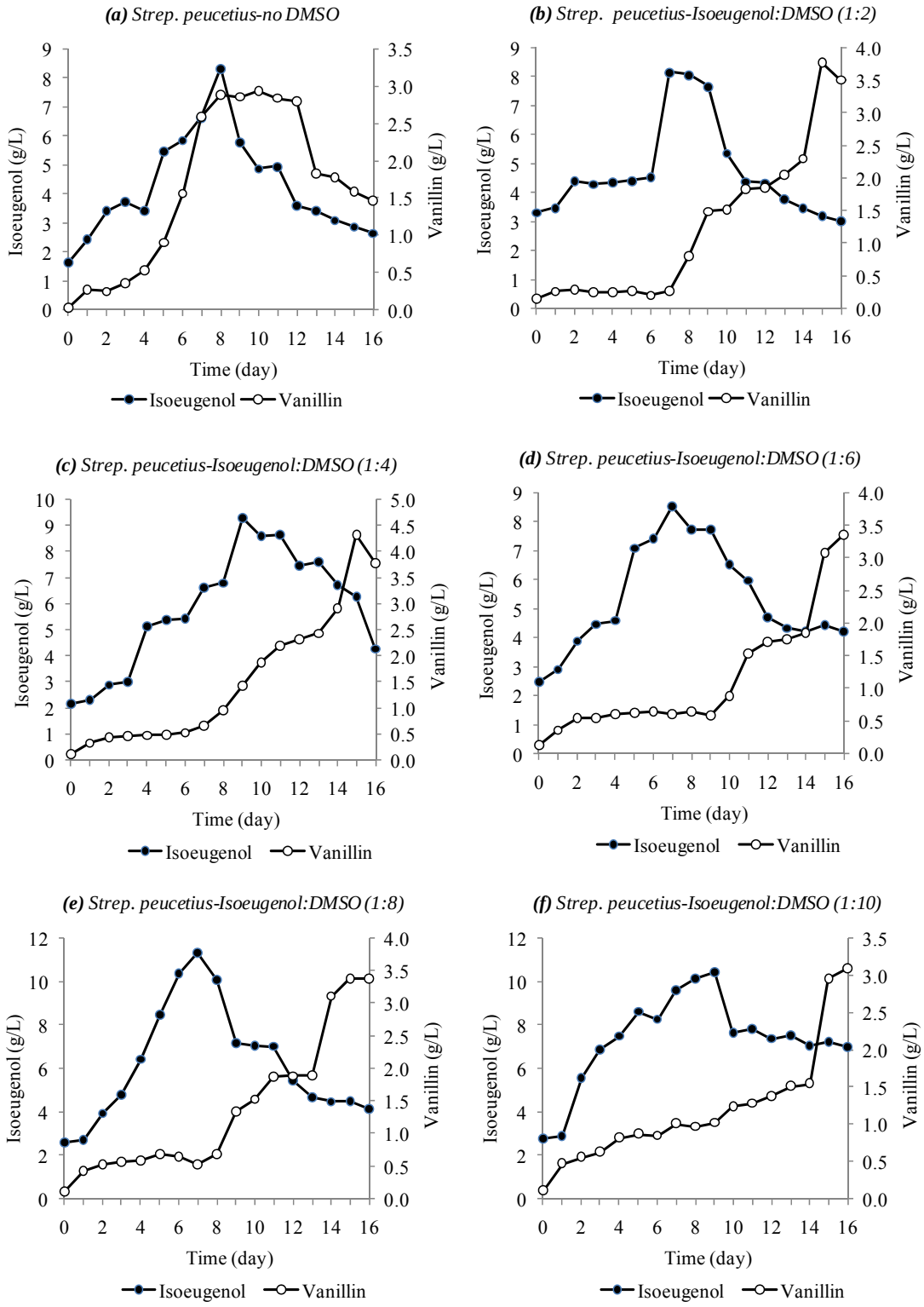
ตาราง 4-4 ผลของปริมาณ DMSO ต่อการไบโอทรานส์ฟอร์เมชัน isoeugenol เพื่อผลิต vanillin โดย *Strep. peucetius* (ต่อ)

isoeugenol : DMSO	วันที่	isoeugenol (g/L)*	vanillin (g/L)*	%conversion**
1:8	0	2.60 ±0.249	0.11 ±0.003	0.60
	1	2.74 ±0.157	0.43 ±0.080	2.34
	2	3.94 ±0.258	0.53 ±0.058	2.88
	3	4.82 ±0.609	0.57 ±0.188	3.10
	4	6.43 ±0.222	0.59 ±0.372	3.21
	5	8.47 ±0.520	0.69 ±0.049	3.75
	6	10.39 ±0.388	0.65 ±0.089	3.54
	7	11.34 ±0.132	0.53 ±0.028	2.88
	8	10.07 ±0.176	0.69 ±0.098	3.75
	9	7.19 ±0.149	1.35 ±0.172	7.35
	10	7.07 ±0.491	1.53 ±0.232	8.32
	11	7.02 ±0.127	1.88 ±0.499	10.23
	12	5.46 ±0.232	1.89 ±0.429	10.28
	13	4.69 ±0.724	1.90 ±0.277	10.34
	14	4.48 ±0.315	3.12 ±0.342	16.98
	15	4.51 ±0.377	3.39 ±0.493	18.44
	16	4.15 ±0.414	3.39 ±0.399	18.43
1:10	0	2.80 ±0.478	0.11 ±0.099	0.60
	1	2.91 ±0.273	0.48 ±0.468	2.61
	2	5.59 ±0.185	0.56 ±0.421	3.05
	3	6.88 ±0.723	0.63 ±0.160	3.43
	4	7.50 ±0.784	0.82 ±0.261	4.46
	5	8.62 ±0.410	0.87 ±0.773	4.73
	6	8.27 ±0.722	0.85 ±0.022	4.62
	7	9.59 ±0.305	1.01 ±0.552	5.50
	8	10.11 ±0.382	0.97 ±0.152	5.28
	9	10.43 ±0.633	1.02 ±0.166	5.55
	10	7.64 ±0.245	1.24 ±0.147	6.75
	11	7.81 ±0.764	1.28 ±0.256	6.96
	12	7.38 ±0.655	1.38 ±0.305	7.51
	13	7.55 ±0.577	1.51 ±0.517	8.22
	14	7.07 ±0.824	1.55 ±0.361	8.43
	15	7.22 ±0.506	2.95 ±0.838	16.05
	16	6.99 ±0.636	3.09 ±0.431	16.83

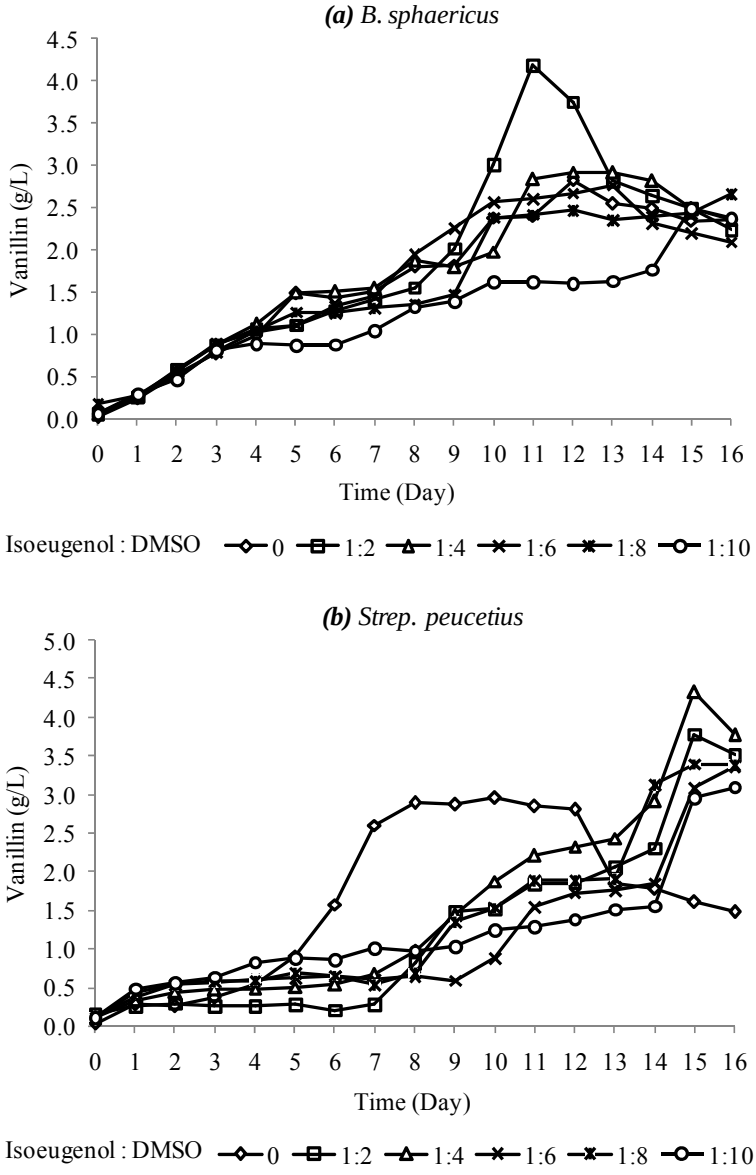
หมายเหตุ: Mean ± SE (n = 3), isoeugenol เริ่มต้น 20 g/L



รูป 4-5 การเปลี่ยนแปลงปริมาณ isoeugenol และ vanillin ในการศึกษาผลของปริมาณ DMSO ต่อการไบโอทรานส์ฟอร์เมชัน isoeugenol โดย *B. sphaericus* เปรียบเทียบการไม่เติม DMSO (a) และเติม DMSO ในอัตราส่วน isoeugenol : DMSO เท่ากับ 1:2 (b), 1:4 (c), 1:6 (d), 1:8 (e) และ 1:10 (f), (n = 3)



รูป 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), (n = 3)

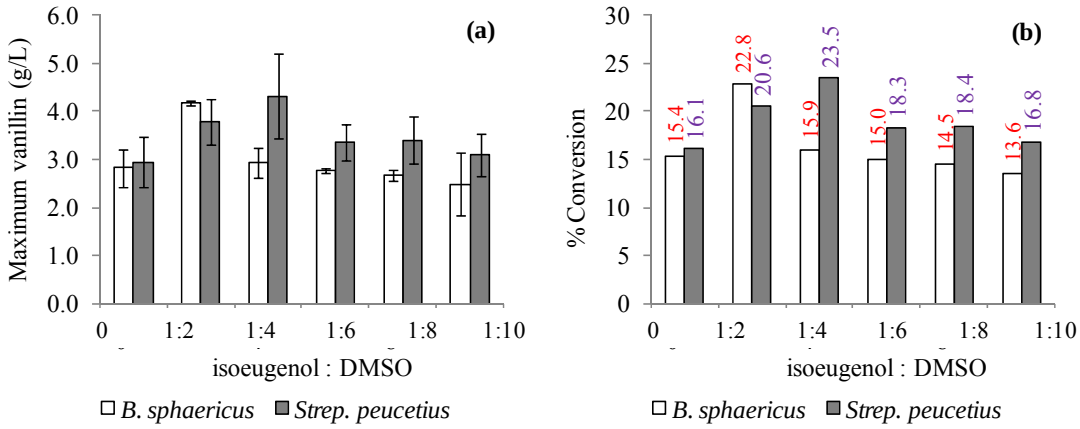


รูป 4-7 การเปลี่ยนแปลงปริมาณ vanillin จากการศึกษาผลของปริมาณ DMSO ต่อการไบโอทรานส์ฟอร์เมชัน isoeugenol โดย *B. sphaericus* (a) และ *Strep. peucetius* (b), (n = 3)

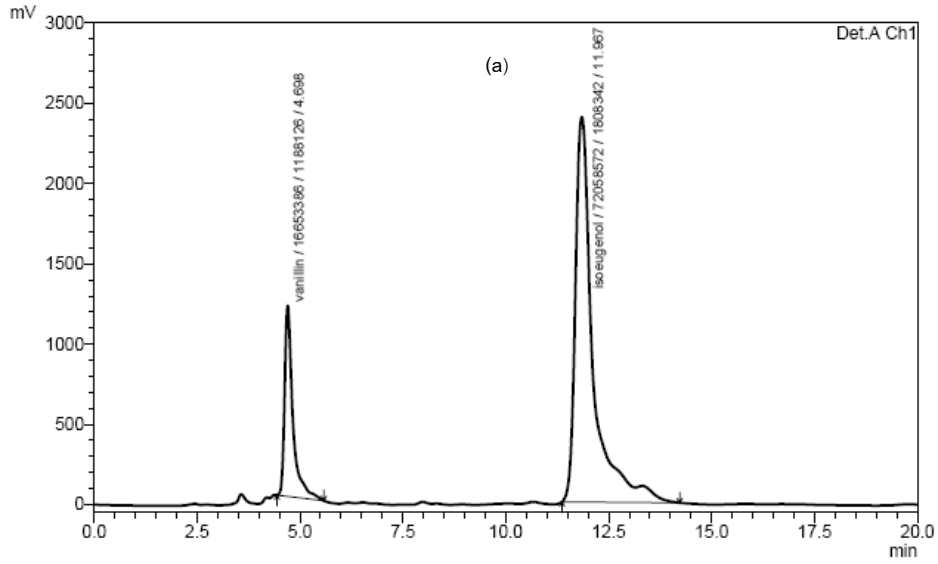
ตาราง 4-5 ปริมาณ vanillin และ %conversion สูงสุดที่ได้จากการศึกษาผลของปริมาณ DMSO ต่อการไบโอทรานส์ฟอร์เมชัน isoeugenol โดย *B. sphaericus* และ *Strep. peucetius*

Isoeugenol : DMSO	*B. sphaericus*		*Strep. peucetius*	
	Max. vanillin (g/L) (day)	%conversion	Max. vanillin (g/L) (day)	%conversion
0	2.82 ± 0.399 (day 12)	15.35	2.95 ± 0.521 (day 10)	16.05
1 : 2	4.18 ± 0.050 (day 11)	22.76	3.78 ± 0.464 (day 15)	20.57
1 : 4	2.92 ± 0.305 (day 12)	15.89	4.32 ± 0.895 (day 15)	23.50
1 : 6	2.76 ± 0.037 (day 13)	15.03	3.36 ± 0.374 (day 16)	18.28
1 : 8	2.66 ± 0.123 (day 16)	14.50	3.39 ± 0.493 (day 15)	18.44
1 : 10	2.47 ± 0.642 (day 15)	13.55	3.09 ± 0.431 (day 16)	16.83

หมายเหตุ: Mean ± SE (n = 3), %conversion = $\left(\frac{mMolar_{vanillin}}{mMolar_{isoeugenol}}\right)\times 100$, isoeugenol เริ่มต้น 20 g/L



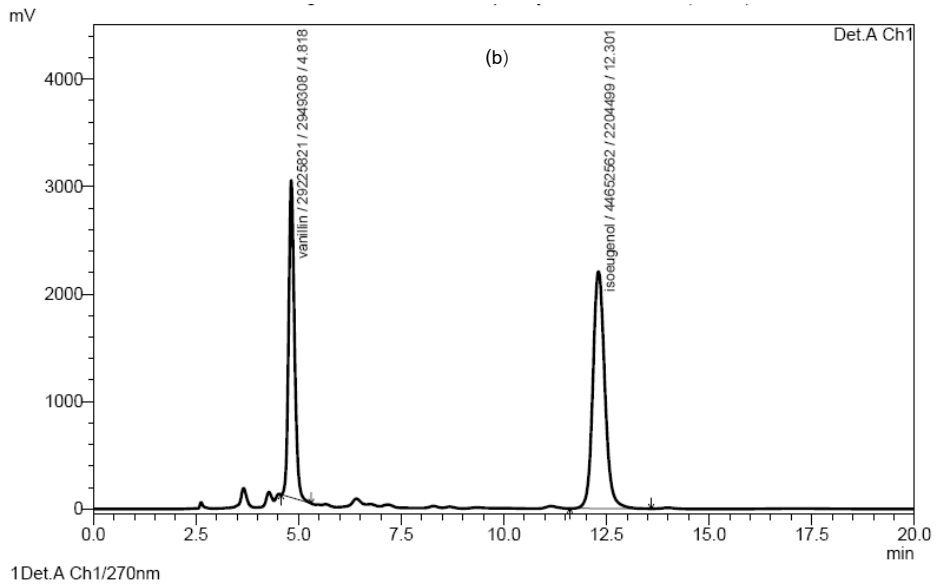
รูป 4-8 ปริมาณ vanillin สูงสุด (a) และ %conversion (b) ที่ได้จากการศึกษาผลของปริมาณ DMSO ต่อการไบโอทรานส์ฟอร์เมชัน isoeugenol โดย *B. sphaericus* และ *Strep. peucetius*, (n = 3)



<Results>

Detector A

ID#	Name	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Units	Mark
1	vanillin	4.698	16653386	1188126	0.000	mg/ml	
2	isoeugenol	11.967	72058572	1808342	0.000	mg/ml	



<Results>

Detector A

ID#	Name	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Units	Mark
1	vanillin	4.818	29225821	2949308	0.000	mg/ml	
2	isoeugenol	12.301	44652562	2204499	0.000	mg/ml	

รูป 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

<u>การทดลอง 3</u> ผลของ amberlite ต่อการไบโอทรานส์ฟอร์เมชัน isoeugenol โดยจุลินทรีย์เพื่อผลิต vanillin

<u>การทดลอง 3.1</u> ประสิทธิภาพของ amberlite ในการดูดซับและปลดปล่อย isoeugenol และ vanillin

เพื่อศึกษาสมบัติของ amberlite ในการดูดซับ (adsorption) และการปลดปล่อย (desorption) ได้เติม amberlite 5, 8, 10, 12, 15% (wet w/v) ร่วมกับ isoeugenol และ vanillin ใน culture medium (pH 7.5) ปริมาตรรวม 50 mL เขย่า flask ด้วยความเร็วรอบ 220 rpm ณ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 ชั่วโมง (ระบบ 1) จากนั้นแบ่ง medium ไปสกัดและวิเคราะห์ปริมาณ isoeugenol และ vanillin ด้วย HPLC เทียบกับระบบที่เติม isoeugenol + amberlite (ระบบ 2) และระบบที่เติม vanillin + amberlite (ระบบ 3) กำหนดประสิทธิภาพในการถูกดูดซับของสารบน amberlite ด้วยค่า %Adsorption และประสิทธิภาพในการปลดปล่อยสารที่ถูกดูดซับจาก amberlite ด้วยค่า %Desoprtion ผลการวิเคราะห์แสดงดังตาราง 4-6 และรูป 4-10

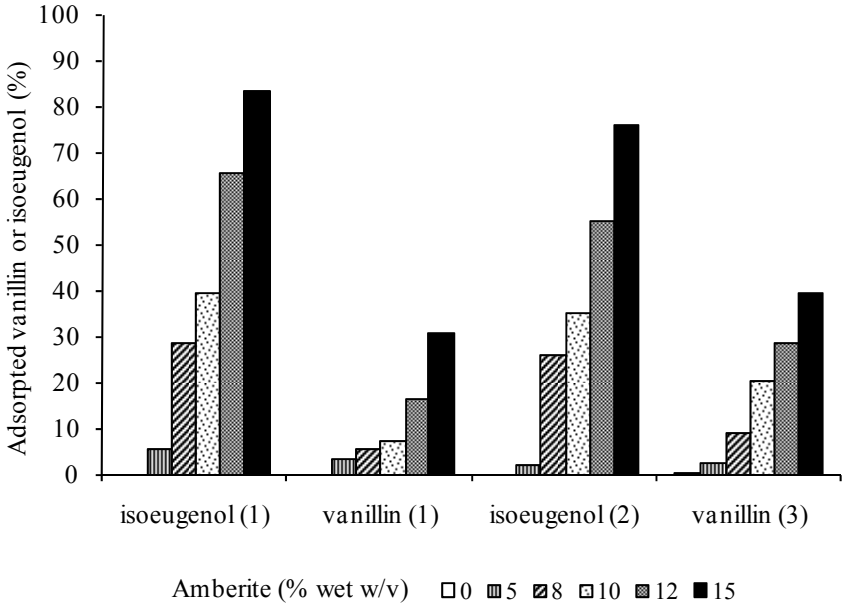
เมื่อนำ culture medium ไปกรอง พบว่ามีสารลักษณะข้นหนืดซึ่งคาดว่าเป็น isoeugenol ติดค้างบนกระดาษกรองจำนวนหนึ่ง ปนอยู่กับ amberlite เมื่อ rinse ด้วย ethyl acetate แล้วนำไปเขย่าต่ออีก 3 ชั่วโมง จากนั้นนำ ethyl acetate fraction จากแต่ละระบบไประเหยแห้ง พบว่าในระบบที่มีเฉพาะ isoeugenol ยังมีสารข้นหนืดเหลืออยู่ เมื่อเติม mobile phase ลงไป สารดังกล่าวกระจายตัวแต่ไม่ละลาย ส่วนในระบบที่มีเฉพาะ vanillin พบผลึกสีขาว เมื่อเติม mobile phase ลงไป สารดังกล่าวละลายได้แต่ไม่สมบูรณ์ เมื่อวิเคราะห์ด้วย HPLC ค่า peak area ที่ได้ไม่สม่ำเสมอ จึงยังไม่สามารถสรุปผลการวิเคราะห์ในส่วนนี้ได้

ในเบื้องต้น จากการคำนวณปริมาณ isoeugenol (Is) และ vanillin (V) ที่คาดว่าถูกดูดซับด้วย amberlite จากผลต่างของค่าที่วิเคราะห์ได้เมื่อมี amberlite และ ไม่มี amberlite พบว่าปริมาณ amberlite ที่เพิ่มขึ้นในระบบมีผลให้ isoeugenol และ vanillin ที่วิเคราะห์ได้ใน medium ลดลง จึงอนุมานว่าสารถูกดูดซับเพิ่มขึ้น โดย amberlite 15% (wet w/v) ดูดซับ isoeugenol มากที่สุดประมาณ 83% (ระบบที่ 1) ซึ่งมากกว่าการดูดซับ vanillin ที่ถูกดูดซับเพียง 30% (ระบบที่ 1) ตามลำดับ จึงเลือกใช้ amberlite 15% ในการทดลองส่วนต่อไป

ตาราง 4-6 ปริมาณ isoeugenol และ vanillin ที่วิเคราะห์ได้ จากการศึกษาประสิทธิภาพของ amberlite ในการดูดซับและปลดปล่อย isoeugenol และ vanillin (การทดลอง 3.1)

ระบบ	culture medium			
	Isoeugenol (Is)		Vanillin (V)	
	(g/L)*	% Ads**	(g/L)*	% Ads**
<u>ระบบ 1</u>				
Isoeugenol (20g/L) + vanillin (20g/L)				
no amberlite	1.39 ± 0.276	0.00	9.34 ± 3.646	0.00
amberlite 5 % (wet w/v)	1.32 ± 0.281	5.69	9.46 ± 3.671	3.68
amberlite 8 % (wet w/v)	0.99 ± 0.359	28.66	9.76 ± 3.747	5.59
amberlite 10 % (wet w/v)	1.44 ± 0.281	39.77	9.57 ± 3.700	7.43
amberlite 12 % (wet w/v)	0.48 ± 0.566	65.65	8.63 ± 3.494	16.58
amberlite 15 % (wet w/v)	0.24 ± 0.679	***83.13***	7.16 ± 3.300	***30.75***
<u>ระบบ 2</u>				
Isoeugenol (20g/L)				
no amberlite	1.54 ± 0.280	0.00	-	-
amberlite 5 % (wet w/v)	1.40 ± 0.289	1.99	-	-
amberlite 8 % (wet w/v)	1.06 ± 0.373	25.96	-	-
amberlite 10 % (wet w/v)	0.93 ± 0.413	35.09	-	-
amberlite 12 % (wet w/v)	0.64 ± 0.533	55.18	-	-
amberlite 15 % (wet w/v)	0.35 ± 0.668	75.82	-	-
<u>ระบบ 3</u>				
Vanillin (20g/L)				
no amberlite	-	-	10.14 ± 4.013	0.00
amberlite 5 % (wet w/v)	-	-	9.87 ± 3.951	2.65
amberlite 8 % (wet w/v)	-	-	9.20 ± 3.821	9.28
amberlite 10 % (wet w/v)	-	-	8.07 ± 3.662	20.40
amberlite 12 % (wet w/v)	-	-	5.22 ± 3.697	28.81
amberlite 15 % (wet w/v)	-	-	6.17 ± 3.678	39.21

* Mean ± SE (n = 3), **%Predicted adsorption (%Ads.) = $\left(\frac{Is,V_{no-amberlite} - Is,V_{with-amberlite}}{Is,V_{no-amberlite}} \right) \times 100$



รูป 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 และ ระบบ (3) ประกอบด้วยvanillin 20 g/L + amberlite

<u>การทดลอง 3.2</u> ผลของ n-hexane/methanol ในการชะล้าง isoeugenol และ vanillin จาก amberlite

เพื่อหา isoeugenol และ vanillin ที่ถูกดูดซับที่ใกล้เคียงค่าจริงมากที่สุด ในการทดลองนี้ ใช้ n-hexane เพื่อสกัด isoeugenol และใช้ methanol เพื่อสกัด vanillin ตามหลักการแยกความแตกต่างด้วยค่าการละลายของสาร และเพิ่มเวลาในการเขย่า flask จาก 3 ช.ม. เป็น 3 วัน เพื่อให้ isoeugenol และ vanillin ละลายได้ตามค่าการละลายของสารอย่างสมบูรณ์มากขึ้น

เมื่อเติม isoeugenol และ vanillin ปริมาณ 20 g/L (1 g) ร่วมกับ amberlite 15% (7.5 g) ใน culture medium pH 7.5 ปริมาตรรวม 50 mL เขย่า flask ด้วยความเร็วรอบ 220 rpm ณ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน แบ่ง medium ส่วนหนึ่งมาสกัดด้วย ethyl acetate และนำไปวิเคราะห์หาปริมาณ free isoeugenol และ free vanillin จากนั้นจึงเติม hexane ใน culture medium ที่เหลือในสัดส่วน culture medium : hexane เท่ากับ 1:3 และนำไปเขย่าต่ออีก 3 ชั่วโมง แบ่ง hexane fraction มาวิเคราะห์หาปริมาณ free isoeugenol + adsorpted-isoeugenol และ free vanillin + adsorpted-vanillin กรองแยก amberlite ออกจาก culture medium แล้วเติม methanol 150 mL และนำไปเขย่าต่ออีก 3 ชั่วโมง จากนั้นจึงแบ่ง methanolic fraction ส่วนหนึ่งมาวิเคราะห์หาปริมาณ adsorpted-isoeugenol และ adsorpted-vanillin ผลการทดลองแสดงดังตาราง 4-7

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า amberlite 15% ดูดซับ isoeugenol มากถึง 98.7% ซึ่งมากกว่าการดูดซับ vanillin ประมาณ 28.6% เมื่อศึกษาการปลดปล่อย isoeugenol และ vanillin โดยชะล้าง amberlite ด้วย hexane และ methanol เทียบจากปริมาณ isoeugenol และ vanillin ที่คาดว่าจะถูกดูดซับจากปริมาณ isoeugenol และ vanillin ทั้งหมด 20 g/L พบว่าการปลดปล่อย isoeugenol และ vanillin จาก amberlite มีค่าเพียง 36.6% และ 6.9% ตามลำดับ

ตาราง 4-7 ปริมาณ isoeugenol และ vanillin ที่วิเคราะห์ได้จากการศึกษาผลของ n-hexane/methanol ในการชะล้าง isoeugenol และ vanillin จาก amberlite (การทดลอง 3.2)

System	in culture medium 50 mL			
	Isoeugenol * (starting amount 20 g/L หรือ 1,000 mg) ①		Vanillin* (starting amount 20 g/L หรือ 1,000 mg) ①	
Free Is, V (ethyl acetate fraction-medium) ②		12.71 ± 1.96 mg		298.33 ± 2.01 mg
Free Is, V (aqueous fraction-medium) ③		-		-
Total Free Is, V ②+③ = ④		12.71 mg		298.33 mg
Predicted adsorption ⑤ (คำนวณจากปริมาณทั้งหมดที่เติมลงในระบบ)	1,000 – 12.71 =	987.29 mg	1,000 – 298.33 =	701.67 mg
%Predicted adsorption ⑥ ⑥ = (⑤/①) x 100	$\left(\frac{987.29}{1000}\right)\times 100 =$	98.73%	$\left(\frac{701.67}{1000}\right)\times 100 =$	70.17%
Free Is, V + adsorpted Is, V (hexane fraction) ⑦		217.95 ± 6.89 mg		70.48 ± 8.77 mg
Adsorpted Is, V (methanolic fraction) ⑧		155.85 ± 1.77 mg		276.55 ± 18.04 mg
Resulted desorption ⑦+⑧-④ = ⑨	217.95+155.85 -12.71=	361.09 mg หรือ 7.22 g/L	70.48+276.55 -298.33 =	48.70 mg หรือ 0.97 g/L
% Desorption⑩ ⑩ = (⑨/⑤) x 100	$\left(\frac{361.09}{987.29}\right)\times 100 =$	36.57%	$\left(\frac{48.70}{701.67}\right)\times 100 =$	6.94%

หมายเหตุ: Mean ± SE, (n = 3)

<u>การทดลอง 3.3</u> ผลของ ethyl acetate/methanol ในการชะล้าง isoeugenol และ vanillin จาก amberlite

ในการทดลองส่วนนี้ ได้ปรับเปลี่ยนตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้ในการชะล้าง amberlite จาก n-hexane เป็น ethyl acetate และลดปริมาณสารตั้งต้น isoeugenol และ vanillin จาก 20 g/L เป็น 10 g/L เพื่อช่วยลดปัญหาที่ isoeugenol และ vanillin ละลายน้ำได้น้อย และเหลือในระบบมากเกินไป ซึ่งมีผลให้การวิเคราะห์ปริมาณ isoeugenol เกิดความผิดพลาดได้

เมื่อเติม isoeugenol และ vanillin ปริมาณ 10 g/L (0.5 g) ใน culture medium pH 7.5 ปริมาตรรวม 50 mL เขย่า flask ด้วยความเร็วรอบ 220 rpm ณ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นนำ culture medium ส่วนหนึ่งมาสกัดด้วย ethyl acetate และนำไปวิเคราะห์หาปริมาณ free isoeugenol และ free vanillin จากนั้นจึงเติม ethyl acetate ใน culture medium ในสัดส่วน culture medium : ethyl acetate เท่ากับ 1:3 และนำไปเขย่าต่ออีก 3 ชั่วโมง แบ่ง ethyl acetate fraction มาวิเคราะห์หาปริมาณ free isoeugenol + adsorpted-isoeugenol และ free vanillin + adsorpted-vanillin กรองแยก amberlite ออกจาก culture medium เติม methanol 150 mL และนำไปเขย่าต่ออีก 3 ชั่วโมง จากนั้นจึงแบ่ง methanolic fraction ส่วนหนึ่งมาวิเคราะห์หาปริมาณ adsorpted-isoeugenol และ adsorpted-vanillin ผลการทดลองแสดงดังตาราง 4-8

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า amberlite 15% ดูดซับ isoeugenol ได้มากถึง 99.5 ซึ่งมากกว่าการดูดซับ vanillin ประมาณ 23.4% เมื่อศึกษาการปลดปล่อย isoeugenol และ vanillin โดยการชะล้าง amberlite ด้วย ethyl acetate และ methanol เทียบจากปริมาณ isoeugenol และ vanillin ที่คาดว่าจะถูกดูดซับจากปริมาณ isoeugenol และ vanillin ทั้งหมด 10 g/L สามารถวิเคราะห์ปริมาณ isoeugenol จากปริมาณที่คาดว่าถูกดูดซับและถูกชะล้างจาก amberlite ประมาณ 43.1% ในขณะที่ vanillin ถูกชะล้างจาก amberlite ได้ประมาณ 18.6%

จากการเปรียบเทียบผลการศึกษา adsorption และ desorption ของ isoeugenol และ vanillin โดย amberlite พบว่าระบบ ethyl acetate-methanol ชะล้าง isoeugenol และ vanillin จาก amberlite ได้ดีกว่าระบบ hexane-methanol ทั้งนี้เนื่องจาก ethyl acetate มีความสามารถในการสกัด isoeugenol และ vanillin มากกว่า hexane และผลจากการลดปริมาณ isoeugenol จาก 20 g/L เป็น 10 g/L เนื่องจากข้อจำกัดด้านการละลาย และมีผลให้พื้นที่การดูดซับเพิ่มขึ้นจากอัตราส่วนระหว่าง isoeugenol และ vanillin ต่อ amberlite ที่เพิ่มขึ้นจาก 1:7.5 เป็น 1:15

ตาราง 4-8 ปริมาณ isoeugenol และ vanillin ที่วิเคราะห์ได้จากการศึกษาผลของ ethyl acetate/methanol ในการชะล้าง isoeugenol และ vanillin จาก amberlite (การทดลอง 3.3)

System	in culture medium 50 mL			
	Isoeugenol (starting amount 10 g/L หรือ 500 mg) ①		Vanillin (starting amount 10 g/L หรือ 500 mg) ①	
Free Is, V (ethyl acetate fraction-medium) ②		2.26 ± 0.70 mg		119.72 ± 7.37 mg
Free Is, V (aqueous fraction-medium) ③		0.29 ± 0.02 mg		0.13 ± 0.03 mg
Total Free Is, V ②+③ = ④		2.55 mg		119.85 mg
Predicted adsorption ⑤ (คำนวณจากปริมาณทั้งหมดที่เติมลงในระบบ)	500 – 2.55 =	497.45 mg	500 – 119.85 =	380.15 mg
%Predicted adsorption ⑥ ⑥ = (⑤/①) x 100	$\left(\frac{497.45}{500}\right)\times 100 =$	99.49%	$\left(\frac{380.15}{500}\right)\times 100 =$	76.03%
Free Is, V + adsorpted Is, V (hexane fraction) ⑦		216.62 ± 7.20 mg		182.40 ± 2.47 mg
Adsorpted Is, V (methanolic fraction) ⑧		0.27 ± 0.15 mg		7.99 ± 0.93 mg
Resulted desorption ⑦+⑧-④ = ⑨	216.62+0.27 -2.55=	214.35 mg หรือ 4.29 g/L	182.40+7.99 -119.85 =	70.55 mg หรือ 1.41 g/L
% Desorption⑩ ⑩ = (⑨/⑤) x 100	$\left(\frac{214.35}{497.45}\right)\times 100 =$	43.09%	$\left(\frac{70.55}{380.15}\right)\times 100 =$	18.56%

หมายเหตุ: Mean ± SE (n = 3)

<u>การทดลอง 3.4</u> ผลของปริมาณ amberlite ต่อการไบโอทรานส์ฟอร์เมชัน isoeugenol

เมื่อเติม isoeugenol 5 g/L (0.25 g) ร่วมกับ amberlite 7.5, 15, 30% (wet w/v) เทียบเท่ากับอัตราส่วน isoeugenol : amberlite เท่ากับ 1:15 (amberlite 3.75 g) , 1:30 (amberlite 7.5 g) และ 1:60 (amberlite 15 g) ใน culture medium ที่มี *B. sphaericus* หรือ *Strep. peucetius* ปริมาตรรวม 50 mL เขย่า flask ด้วยความเร็วรอบ 220 rpm อุณหภูมิห้อง จากนั้นวิเคราะห์หาปริมาณ isoeugenol และ vanillin ใน culture medium ด้วยเทคนิค HPLC ณ วันที่ 10 ของการทดลอง ผลการทดลองแสดงดังตาราง 4-9

ผลการทดลองพบว่าการเติม amberlite ปริมาณมากขึ้นมีผลเพิ่มการผลิต vanillin แบบสัมพันธ์กับความเข้มข้น โดย amberlite 30% (wet weight) มีผลให้ทั้ง *B. sphaericus* และ *Strep. peucetius* ผลิต vanillin ได้สูงสุด ประมาณ 12.7 และ 16.4% ตามลำดับ

ตาราง 4-9 ปริมาณ isoeugenol และ vanillin ที่วิเคราะห์ได้จากการศึกษาผลของปริมาณ amberlite ต่อการไบโอทรานส์ฟอร์เมชัน isoeugenol (การทดลอง 3.4)

จุลินทรีย์	amberlite (%)	isoeugenol (g/L)	vanillin (g/L)	%conversion
B. sphaericus	7	2.49 ± 0.34	0.35 ± 0.02	7.51
	15	2.97 ± 0.42	0.38 ± 0.12	8.24
	30	3.73 ± 0.13	0.59 ± 0.24	12.69
Strep. peucetius	7	3.43 ± 0.20	0.56 ± 0.04	12.14
	15	3.51 ± 0.06	0.70 ± 0.03	15.14
	30	3.59 ± 0.03	0.76 ± 0.02	16.41

หมายเหตุ: Mean ± SE (n = 3), %conversion = $\left(\frac{mMolar_{vanillin}}{mMolar_{isoeugenol}}\right)\times 100$, isoeugenol เริ่มต้น 5 g/L

<u>การทดลอง 4</u> ผลร่วมของปริมาณ isoeugenol และ DMSO ต่อการผลิต vanillin ในการไบโอ-ทรานส์ฟอร์เมชัน isoeugenol

จากผลการศึกษาผลของปริมาณ isoeugenol, DMSO และ amberlite ต่อการผลิต vanillin ในการไบโอทรานส์ฟอร์เมชัน isoeugenol พบว่า ปริมาณ isoeugenol และ DMSO มีผลต่อการผลิต vanillin และมีผลต่างกันสำหรับ *B. sphaericus* และ *Strep. Peucetius* จึงทำการศึกษาผลร่วมของแต่ละสภาวะที่ให้ %conversion ในการผลิต vanillin สูงสุด แม้ว่าการเติม amberlite จะมีผลต่อการผลิต vanillin เช่นกัน แต่ไม่ได้นำมาเป็นปัจจัยร่วมในการศึกษาด้วย เนื่องจาก vanillin ที่ได้ถูกดูดซับไว้มาก ทำให้ %conversion ที่วิเคราะห์ได้ลดลง

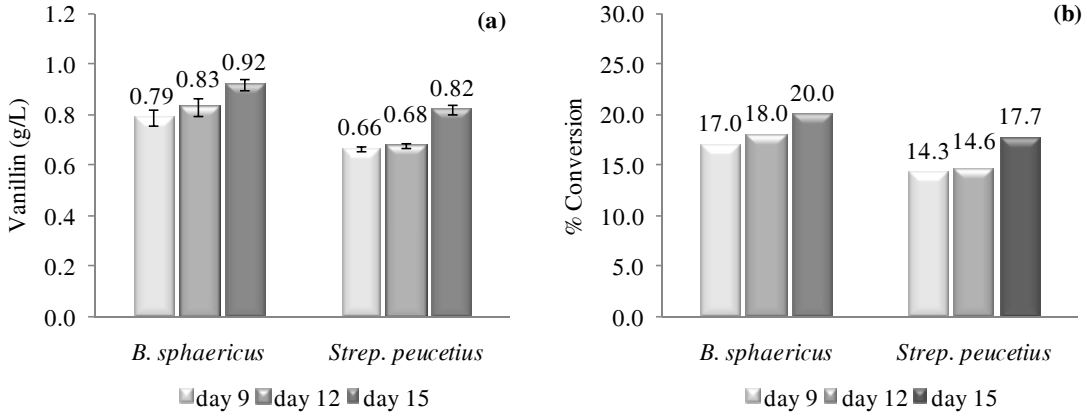
ในการทดลองนี้ใช้สารตั้งต้น isoeugenol 5 g/L (0.25 g) ร่วมกับ DMSO ในอัตราส่วน isoeugenol : DMSO เท่ากับ 1:2 สำหรับ *B. sphaericus* และ 1:4 สำหรับ *Strep. peucetius* ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์หาปริมาณ isoeugenol และ vanillin ใน culture medium ด้วยเทคนิค HPLC ณ วันที่ 10, 12 และ 15 ของการเพาะเลี้ยง พบว่า ณ วันที่ 15 *B. sphaericus* ผลิต vanillin ได้สูงสุด 0.9 g/L (%conversion 20) และ *Strep. peucetius* ผลิต vanillin ได้สูงสุด 0.8 g/L (%conversion 17.7) ตามลำดับ ซึ่งผลผลิต vanillin ที่ได้ต่ำกว่าระบบที่ใช้ isoeugenol 20 g/L แต่เติม DMSO ในอัตราส่วนเท่ากันกับการทดลองนี้สำหรับเชื้อทั้งสองชนิด นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อทั้งสองชนิดผลิต vanillin ได้ช้าลง จึงยังคงเห็นแนวโน้มการเพิ่มขึ้นของ vanillin หลังวันที่ 15 ของการทดลอง

ผลการทดลองแสดงดังตาราง 4-10 และรูป 4-11

ตาราง 4-10 ปริมาณ vanillin และ %conversion สูงสุดที่ได้จากการศึกษาผลร่วมของปริมาณ isoeugenol และ DMSO ต่อการไบโอทรานส์ฟอร์เมชัน isoeugenol โดย *B. sphaericus* และ *Strep. peucetius*

จุลินทรีย์	day	isoeugenol (g/L)	vanillin (g/L)	%conversion
B. sphaericus	10	0.96 ± 0.039	0.79 ± 0.029	17.0
(Isoeugenol 0.25g :	12	0.69 ± 0.059	0.83 ± 0.035	18.0
DMSO 0.5 mL)	15	0.58 ± 0.053	0.92 ± 0.023	20.0
Strep. Peucetius	10	0.38 ± 0.085	0.66 ± 0.009	14.3
(Isoeugenol 0.25g :	12	0.49 ± 0.071	0.68 ± 0.009	14.6
DMSO 1 mL)	15	0.57 ± 0.144	0.82 ± 0.019	17.7

หมายเหตุ: Mean ± SE (n = 3), %conversion = $\left(\frac{mMolar_{vanillin}}{mMolar_{isoeugenol}}\right)\times 100$



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

บทที่ 5
อภิปรายผลการวิจัย

ในงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการผลิต vanillin จากการไบโอทรานส์-ฟอร์ม isoeugenol ด้วยจุลินทรีย์สองสายพันธุ์คือ *Bacillus sphaericus* ATCC 13805 และ *Streptomyces peucetius* var. caesius TISTR 3355 ปัจจัยที่ทำการศึกษาได้แก่ ผลของปริมาณ isoeugenol, DMSO และ amberlite XAD-2 ตลอดจนการศึกษาผลของปัจจัยร่วมเหล่านี้

จากการศึกษาผลของปริมาณสารตั้งต้น isoeugenol (5, 10, 15, 20 g/L) พบว่า *B. sphaericus* ใช้ isoeugenol 20 g/L ผลิต vanillin ได้มากที่สุด3.5 g/L ณ วันที่ 10 ของการเพาะเลี้ยง ส่วน *Strep. peucetius* ใช้ isoeugenol 15 g/L ผลิต vanillin ได้มากที่สุด 4.3 g/L ณ วันที่ 10 ของการเพาะเลี้ยง และเมื่อเพิ่มปริมาณ isoeugenol เป็น 20 g/L *Strep. peucetius* จะผลิต vanillin ได้ลดลง แต่หากพิจารณาจากค่า %conversion ซึ่งคำนวณจากอัตราส่วนระหว่าง mMolar ของ vanillin ที่เกิดขึ้นและ mMolar ของ isoeugenol เริ่มต้น จะเห็นได้ว่าการใช้ isoeugenol 5 g/L ให้ %conversion สูงสุด ทั้งนี้เนื่องจากข้อจำกัดด้านการละลายของ isoeugenol สอดคล้องกับรายงานของ Zhao และคณะ (2005) ในการผลิต vanillin ด้วย *B. fusiformis* CGMCC1347 cells และใช้ isoeugenol 60% (v/v) (หรือ 600 g/L) เป็นทั้งสารตั้งต้นและตัวทำละลายในระบบของเหลวสองวัฏภาค (two-phase system) ซึ่งให้ผลผลิต vanillin มากที่สุด (32.5 g/L) ในชั้น isoeugenol ภายในเวลา 72 ช.ม. ของการเพาะเลี้ยง อธิบายได้ว่าเมื่อในระบบมีปริมาณสารตั้งต้นมากจึงเกิดสารผลิตภัณฑ์ขึ้นมากตามไปด้วย นอกจากนี้ isoeugenol ยังทำหน้าที่เป็นตัวทำละลายให้กับ vanillin ทำให้การสังเคราะห์ vanillin เกิดได้มากขึ้นตามการ shift ของปฏิกิริยาการสังเคราะห์มายังด้านผลิตภัณฑ์

Furukawa และคณะ (2003) รายงานผลการไบโอทรานส์ฟอร์ม isoeugenol โดยใช้ *P. putida* I58 ว่า ได้สารผลิตภัณฑ์เป็น vanillic acid โดยไม่มีการสะสมของ vanillin ต่อมา Yamada และคณะ (2007) รายงานว่า *P. putida* I58, strain IE27 ที่แยกได้จากดิน ไบโอทรานส์ฟอร์ม isoeugenol ได้ vanillin เป็นสารผลิตภัณฑ์หลัก และสรุปว่า isoeugenol ความเข้มข้นสูงมีผลยับยั้งแอคติวิตี้ของ *P. putida* IE27 ในการ oxidized vanillin ไปเป็น vanillic acid จึงเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิต vanillin ได้ แต่เนื่องจาก *P. putida* I58 มีความไวต่อ isoeugenol ค่อนข้างน้อย จึงไม่ได้ vanillin เป็นสารผลิตภัณฑ์หลัก จากรายงานการศึกษาดังกล่าว ทำให้อนุมานได้ว่า vanillin ที่ผลิตได้เพิ่มขึ้นจากผลของ isoeugenol ที่เพิ่มมากขึ้นในงานวิจัยนี้นั้น อาจเกิดจากการที่ isoeugenol มีผล

ยับยั้งการเกิด oxidation ของ vanillin ไปเป็น vanillic acid หรือ oxidized products อื่นๆ ในทำนองเดียวกัน แต่ยังต้องทำการศึกษาหาปริมาณ vanillic acid หรือ oxidized products ในระบบต่อไป

อย่างไรก็ตาม ปริมาณ isoeugenol ที่ให้ผลผลิตมากที่สุดจากผลการศึกษาของ Yamada และคณะ (2007) คือ 200 mM (32.84 g/L) ซึ่งมากกว่าความเข้มข้นที่ใช้ในกรณีของ *B. sphaericus* ส่วนหนึ่งเป็นผลจากความต่างของสายพันธุ์ แต่เนื่องจาก isoeugenol ที่ใช้ในงานวิจัย (20 g/L) เป็นปริมาณสูงสุดที่ใช้ทดลอง ดังนั้นการเพิ่มปริมาณ isoeugenol จึงอาจมีผลเพิ่มหรือลดการผลิต vanillin ยังไม่สามารถสรุปได้ ปริมาณ isoeugenol ที่เหมาะสมสำหรับ *Strep. peucetius* จะมีค่าต่ำกว่า (15 g/L) และการใช้ isoeugenol ความเข้มข้นสูง (20 g/L) ทำให้การผลิต vanillin มีแนวโน้มลดลง ซึ่งเป็นไปได้ว่า isoeugenol ความเข้มข้นสูงอาจเป็นพิษต่อ *Strep. peucetius* แสดงให้เห็นว่าจุลินทรีย์ต่างสายพันธุ์มีความทนต่อ isoeugenol ต่างกัน

การกล่าวถึงความเป็นพิษของ isoeugenol ต่อจุลินทรีย์นี้ พบในรายงานของ Kasana และคณะ (2007) ซึ่งได้ศึกษาหาสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่สามารถเปลี่ยน isoeugenol ไปเป็น vanillin เพื่อลดข้อจำกัดจากทั้งความเป็นพิษของสารตั้งต้นและผลิตภัณฑ์ต่อจุลินทรีย์ และการสลายตัวของ vanillin ไปเป็น vanillyl alcohol และ vanillic acid ซึ่งทำให้ vanillin ที่ผลิตได้จาก isoeugenol มี % molar yield ต่ำ Kasana และคณะได้จุลินทรีย์จากตัวอย่างดินของพืชสายพันธุ์ *Ocimum* ซึ่งเป็นแหล่งของสารในกลุ่ม phenylpropanoids และ isoeugenol ผลการศึกษาพบว่า *Pseudomonas chlororaphis* เป็นสายพันธุ์ที่ผลิต vanillin ได้มากที่สุด เมื่อนำมาใช้ในการไบโอทรานส์ฟอร์ม isoeugenol ในช่วงความเข้มข้น 0.5 - 2.0% พบว่า isoeugenol 1.0% ให้ yield สูงสุด (1.2 g/L, % molar efficiency 12.64) ภายใน 24 ชั่วโมงของการทดสอบ และวิเคราะห์ว่า isoeugenol ความเข้มข้นสูงเป็นพิษต่อจุลินทรีย์ ซึ่งความเป็นพิษของ isoeugenol ต่อจุลินทรีย์นี้ได้ถูกกล่าวถึงในงานวิจัยของ Zhang และคณะ (2006) เช่นกัน

Yamada และคณะ (2007) กล่าวถึงการใช้ isoeugenol ความเข้มข้นสูงในระบบของเหลวสองวัฏภาคในงานวิจัยของ Zhao และคณะ (2005) ว่า ยังไม่ใช่วิธีที่มีประสิทธิภาพมากนัก เนื่องจากร้อยละการเปลี่ยนแปลง isoeugenol ไปเป็น vanillin ยังมีค่าต่ำมาก และการแยก vanillin ทำได้ยาก ดังนั้นวิธีการที่เหมาะสมมากกว่าคือระบบวัฏภาคเดียวที่มีการเติม 10% (v/v) DMSO เพื่อช่วยละลาย isoeugenol ซึ่งมีค่าการละลายในน้ำเพียง 6 mM หรือประมาณ 0.49 g/L และการใช้ isoeugenol เป็นสารตั้งต้นปริมาณมาก ทำให้ค่า %conversion ที่คำนวณได้มีค่าน้อย สอดคล้องกับผลการทดลองของคณะผู้วิจัยซึ่งพบว่า isoeugenol 5 g/L ให้ค่า %conversion สูงสุด ดังนั้นในการวิจัยส่วนต่อไปคณะผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาผลของการเติม DMSO ซึ่งมีสมบัติเป็นสารช่วยละลาย (solubilizing agents) ต่อการผลิต vanillin

จากการศึกษาผลของปริมาณ DMSO ในการไบโอทรานส์ฟอร์ม isoeugenol ไปเป็น vanillin พบว่าปริมาณ DMSO ที่แตกต่างกันมีผลต่อการผลิต vanillin และในจุลินทรีย์ต่างสายพันธุ์

จะให้ผลต่างกัน เมื่อใช้ DMSO ในอัตราส่วน isoeugenol: DMSO เท่ากับ 1:2 *B. sphaericus* สามารถผลิต vanillin ได้สูงสุดเท่ากับ 4.2 g/L (%conversion 22.76) ในวันที่ 11 ของการเพาะเลี้ยง แต่เมื่อเพิ่มปริมาณ DMSO มากขึ้นจะมีผลให้ vanillin ผลิตได้ลดลง และ ณ อัตราส่วน 1:8 และ 1:10 vanillin ที่ผลิตได้จะต่ำลงกว่าเมื่อไม่เติม DMSO สำหรับ *Strep. peucetius* เมื่อใช้ DMSO ในอัตราส่วน isoeugenol: DMSO เท่ากับ 1:4 จะสามารถผลิต vanillin ได้สูงสุด 4.3 g/L (%conversion 23.50) ในวันที่ 15 ของการเพาะเลี้ยง ซึ่งปริมาณ vanillin ที่ผลิตได้นั้นใกล้เคียงกับผลที่ได้จาก *B. sphaericus* แต่จะใช้เวลาในการผลิต vanillin มากกว่า อย่างไรก็ตามการเพิ่มปริมาณ DMSO เป็น 1:6, 1:8 และ 1:10 มีผลให้ vanillin ผลิตได้ลดลงตามลำดับ ผลการศึกษาดังกล่าวมีความสอดคล้องกับรายงานของ Yamada และคณะ (2007) ซึ่งศึกษาผลของปริมาณ DMSO ต่อการผลิต vanillin โดย *Pseudomonas putida* IE27 และพบว่า DMSO 10% (v/v) (เทียบเท่า isoeugenol: DMSO เท่ากับ 1:4) มีผลเพิ่มการผลิต vanillin ได้มากที่สุด และการเพิ่มปริมาณ DMSO มีผลให้การผลิต vanillin ลดลง

การที่ DMSO มีผลในการเพิ่มผลผลิต vanillin นั้นอาจเนื่องมาจาก DMSO ช่วยละลาย isoeugenol เป็นผลให้มีปริมาณสารตั้งต้นละลายในระบบมากขึ้น ซึ่ง isoeugenol ในระบบนอกจากจะมีส่วนช่วยในการละลาย vanillin แล้ว ยังมีส่วนช่วยยับยั้งการเกิด oxidation ของ vanillin ไปเป็น vanillic acid (Yamada et al., 2007) นอกจากนี้ผลการวิจัยยังแสดงให้เห็นว่า DMSO มีผลต่อการผลิต vanillin ต่างกันในจุลินทรีย์ต่างสายพันธุ์กันด้วย

มีงานวิจัยหลายเรื่องที่กล่าวถึงการใช้สารดูดซับประเภทเรซิน (adsorbent resin) ในการเพิ่มปริมาณผลผลิตจากกระบวนการหมักและไบโอทรานส์ฟอร์เมชัน เช่น Zhao และคณะ (2006) รายงานผลการใช้สารดูดซับ HD-8 ในการเพิ่มผลผลิต vanillin โดย *B. fusiformis* การเติม HD-8 มีผลลดการเกิด product inhibition และทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีความคงตัว Xue และคณะ (2010) รายงานการเพิ่มผลผลิต (R)-(−)-mandelic acid จาก (R,S)-mandelonitrile โดยเชื้อ *Alcaligenes faecalis* CCTCC M 208168 โดยเปรียบเทียบการใช้ anion-exchange resins ชนิดต่างๆ (D202, D315, D293, HZ202, 335 and 717) เรียกว่าเทคนิค *in situ* production removal (ISPR) เพื่อลดผลจากการที่สารผลิตภัณฑ์มีผลยับยั้งเอนไซม์ nitrilases ซึ่งผลิตจากจุลินทรีย์ดังกล่าว นอกจากนี้ยังมีรายงานของ Shimoni และคณะ (2000) ที่สรุปว่าการเติม 10% w/w amberlite XAD-2 เป็น adsorbent ช่วยให้จุลินทรีย์เจริญเติบโตดีขึ้น และเพิ่มผลผลิต vanillin ได้

ดังนั้นในการศึกษาส่วนต่อไป คณะผู้วิจัยจึงทำการศึกษาผลของ amberlite XAD-2 ซึ่งใช้เป็น adsorbent ต้นแบบ เพื่อศึกษาผลของการเติม adsorbent ต่อการผลิต vanillin จาก isoeugenol โดยเริ่มทำการศึกษาการดูดซับและปลดปล่อย isoeugenol และ vanillin จาก amberlite 5-15% (wet w/v) โดยคำนวณจากปริมาณ isoeugenol และ vanillin ที่คาดว่าถูกดูดซับด้วย amberlite จากผลต่างของปริมาณสารเมื่อมี amberlite และไม่มี amberlite วิเคราะห์โดยใช้เทคนิค HPLC ผลการทดลองพบว่า ปริมาณ amberlite ที่มากขึ้นจะดูดซับ isoeugenol และ vanillin มากขึ้นสัมพันธ์กับความ

เข้มข้น และ amberlite 15% (wet w/v) ซึ่งเป็นปริมาณที่มากที่สุดในการทดลอง ดูดซับ isoeugenol ได้มากที่สุด 83.1% ซึ่งมากกว่าการดูดซับ vanillin ที่ถูกดูดซับเพียง 30.8% ตามลำดับ ในการทดลองส่วนต่อไปจึงเลือกใช้ amberlite ปริมาณ 15% อย่างไรก็ตาม เนื่องจากข้อจำกัดด้านการละลายของทั้ง isoeugenol และ vanillin ทำให้ isoeugenol และ vanillin ปริมาณมากยังคงเหลือในระบบ และไม่สามารถแยกออกจาก amberlite โดยการกรอง

Zhao และคณะ (2006) ศึกษาการใช้สารดูดซับ HD-8 ในการเพิ่มผลผลิต vanillin โดย *B. fusiformis* และแยก isoeugenol และ vanillin จาก HD-8 resin โดยการชะล้าง (elute) ด้วย n-hexane และ ethanol โดยได้ %recovery เท่ากับ 78.4 (vanillin ratio in ethanol) และ 69.9 (isoeugenol ratio in n-hexane) ตามลำดับ ซึ่งระบบการแยก isoeugenol และ vanillin ดังกล่าวได้นำมาประยุกต์ใช้ในงานวิจัยนี้

amberlite XAD-2 มีคุณสมบัติเป็น crosslinked polystyrene copolymer resin ชนิด hydrophobic ขนาด 20-60 mesh โดยทั่วไปใช้ในการดูดซับสารอินทรีย์ที่ละลายได้ในน้ำและตัวทำละลายอินทรีย์ รวมทั้งการแยกสารในกลุ่ม antibiotics, organic nitrogen, grease และ aromatic compounds ในน้ำ โดยทั่วไปสารที่มีความเป็น hydrophobic มากจะถูกดูดซับบน amberlite ได้มาก โดยแรงดึงดูดชนิด van der Waaals การทำให้สารที่ถูกดูดซับนั้นถูกปล่อยออกจาก amberlite ทำได้โดยการเปลี่ยน hydrophobic/hydrophilic balances เช่น กรดอ่อนจะถูกดูดซับได้ดีกว่ารูปเกลือ และสามารถทำให้กรดอ่อนนั้นแยกจาก amberlite ได้โดยการชะล้างด้วย sodium hydroxide หรือในกรณี fatty amine ซึ่งในรูปเบสจะถูกดูดซับได้ดี และชะล้างได้ด้วยกรด เป็นต้น ในทำนองเดียวกันตัวทำละลายผสม เช่น ตัวทำละลายมีขั้วและน้ำ ก็จะสามารถชะล้างสารที่ถูกดูดซับบน amberlite ได้หาก eluting solvent ที่ใช้มีความชอบต่อสารที่ถูกดูดซับนั้นมากกว่า resin (Supelco, product specification, 1997) ซึ่งผลการใช้ n-hexane /methanol เป็น eluting solvent เพื่อแยก isoeugenol และ vanillin พบว่า %recovery (หรือ %Desorption) มีค่าประมาณ 36.6 และ 6.9 ซึ่งต่ำกว่าค่าที่ได้จากการศึกษาของ Zhao และคณะ (2006) อย่างมาก

เมื่อเปลี่ยนมาใช้ ethyl acetate /methanol ในการชะล้าง isoeugenol และ vanillin จาก amberlite ร่วมกับการลดปริมาณ isoeugenol จาก 20 g/L เป็น 10 g/L ซึ่งอัตราส่วนระหว่าง isoeugenol : amberlite จะเท่ากับ 1:15 เมื่อเทียบกับการทดลองที่ผ่านมา ในระบบจะมีปริมาณ amberlite เพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่าของปริมาณ isoeugenol ผลการทดลองพบว่า amberlite ดูดซับ isoeugenol และ vanillin 99.5 และ 76 % ตามลำดับ และเมื่อชะล้างด้วย ethyl acetate /methanol isoeugenol และ vanillin จะถูกปล่อยจากตัวดูดซับเพียง 43.1 และ 18.6% เมื่อเทียบจากปริมาณ isoeugenol และ vanillin ที่ถูกดูดซับทั้งหมด ตามลำดับ

จะเห็นได้ว่าเมื่อชะล้าง amberlite ด้วย ethyl acetate /methanol สามารถแยก isoeugenol และ vanillin จาก amberlite ได้เพิ่มขึ้นมากกว่าเมื่อชะล้างด้วย hexane/methanol คิดเป็น 17.83 และ

167.44 % แสดงให้เห็นว่าการใช้ ethyl acetate/methanol เป็น eluting solvent เหมาะสมกว่าการใช้ hexane /methanol ซึ่งเป็นผลจากความเข้ากันได้ของสภาพขั้วของสารตามหลัก like dissolve like กล่าวคือ สารที่มีสภาพขั้วใกล้เคียงกันจะเข้ากันได้

เมื่อทดลองเติม amberlite 7.5, 15, 30% (wet w/v) ร่วมกับ isoeugenol 5 g/L (0.25 g) ซึ่งเทียบเท่ากับอัตราส่วน isoeugenol : amberlite เท่ากับ 1:15 (amberlite 3.75 g) , 1:30 (amberlite 7.5 g) และ 1:60 (amberlite 15 g) ใน culture medium ที่มี *B. sphaericus* หรือ *Strep. peucetius* และวิเคราะห์หาปริมาณ isoeugenol และ vanillin ใน culture medium ด้วยเทคนิค HPLC ณ วันที่ 10 ของการทดลอง พบว่าการใช้ปริมาณ amberlite มากขึ้นมีผลให้ *B. sphaericus* หรือ *Strep. peucetius* ผลิต vanillin มากขึ้นสัมพันธ์กับความเข้มข้น โดย amberlite 30% (wet weight) มีผลให้ทั้ง *B. sphaericus* และ *Strep. peucetius* ผลิต vanillin ได้สูงสุด 0.59 และ 0.76 g/L หรือคิดเป็น %conversion (molar yield) ประมาณ 12.7 และ 16.4% ตามลำดับ

เป็นไปได้ว่า amberlite ที่เติมลงในระบบดูดซับ isoeugenol บางส่วนไว้และค่อยๆ ปลดปล่อยออกมาระหว่างการเขย่า (reservoir) จึงมีผลลดการเกิด product inhibition (Zhao et al., 2006) โดยลดผลของ vanillin ที่มีผลยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ ตลอดจนช่วยลดการเสื่อมสลายของ isoeugenol ซึ่ง Shimoni และคณะ (2000) กล่าวว่า isoeugenol กว่าร้อยละ 80 เกิดการเสื่อมสลายไป มีเพียงร้อยละ 5 เท่านั้นที่เปลี่ยนไปเป็น vanillin ทำให้ผลผลิต vanillin ต่ำ และ isoeugenol เองอาจเป็นปัจจัยจำกัดการเจริญ (growth limiting factor) ของจุลินทรีย์ ทั้งนี้เมื่อคำนวณปริมาณ vanillin ที่ผลิตได้จากการศึกษาผลของ amberlite ในการไบโอทรานส์ฟอร์ม isoeugenol โดยจุลินทรีย์ทั้งสองชนิด พบว่าการเติม amberlite ในระบบนั้น แม้ว่าจะมีผลเพิ่มการผลิต vanillin ได้ระดับหนึ่ง แต่โดยรวมแล้วผลผลิตที่ได้ต่ำกว่าระบบที่ไม่เติม amberlite เป็นไปได้ว่ายังมี vanillin ปริมาณมากถูกดูดซับไว้ใน amberlite หรือ vanillin เกิดการเสื่อมสลายไป ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงอาจกล่าวได้ว่าการเติมสารดูดซับ amberlite XAD-2 ภายใต้ภาวะที่ทำการศึกษายังไม่ใช่สภาวะที่เหมาะสมในการพัฒนาการเพิ่มผลผลิต vanillin เมื่อใช้ *B. sphaericus* หรือ *Strep. peucetius* ในการผลิต

อย่างไรก็ตามปัจจัยสำคัญในการประยุกต์เทคนิค ISPR ให้ประสบความสำเร็จคือการเลือกใช้ชนิดของ resin ให้เหมาะสม โดยมีข้อกำหนดเบื้องต้นคือ resin ควรมีความสามารถในการดูดซับผลิตภัณฑ์มาก และมีความจำเพาะที่จะไม่ให้เกิดการจับแน่นของสารตั้งต้น (Xue et al., 2010) ซึ่งในงานวิจัยนี้คณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษาโดยใช้ resin เพียงชนิดเดียว ซึ่งอาจไม่ใช่สารดูดซับชนิดที่เหมาะสมสำหรับเพิ่มผลผลิต vanillin การศึกษาหาชนิดของสารดูดซับ ตลอดจนการหา eluting solvent ที่เหมาะสมในการแยก vanillin ออกจาก amberlite จึงยังคงต้องทำการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

เมื่อทำการศึกษาผลร่วมของปัจจัยต่างๆ มีผลต่อการผลิต vanillin โดยเชื้อ *B. sphaericus* และ *Strep. peucetius* โดยกำหนดใช้ 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 0.9 g/L (%conversion 20) และ *Strep. peucetius* ผลิต vanillin ได้สูงสุด 0.8 g/L (%conversion 17.7) ตามลำดับ ซึ่งผลผลิต vanillin ที่ได้ต่ำกว่าระบบที่ใช้ isoeugenol 20 g/L แต่เติม DMSO ในอัตราส่วนเท่ากันกับการทดลองนี้ สำหรับเชื้อทั้งสองชนิด อย่างไรก็ตามยังคงเห็นแนวโน้มการเพิ่มขึ้นของ vanillin หลังวันที่ 15 ของการทดลอง ทั้งนี้อาจเกิดจากผลของ DMSO ที่มีผลให้การผลิต vanillin ช้าลง จึงควรทดลองเพิ่มเติมโดยใช้เวลาในการผลิตเพิ่มขึ้น ซึ่งผู้วิจัยคาดว่าน่าจะได้ผลผลิต vanillin เพิ่มมากขึ้น

ทั้งนี้ในงานวิจัยได้ทำการวิเคราะห์เฉพาะปริมาณ vanillin โดยไม่ได้ทำการวิเคราะห์ปริมาณ side products อื่นๆ เช่น vanillic acid ซึ่งสัมพันธ์กับการเสื่อมสลายของ vanillin โดยปฏิกิริยา oxidation (Furukawa et al., 2003) ตลอดจนสารอื่นๆ ที่มีรายงานว่าพบในไบโอทรานส์ฟอร์เมชันของ isoeugenol เช่น dehydrodyisoeugenol และ isoeugenol-diol (Zhang et al., 2006) การศึกษา side product จากปฏิกิริยาจึงเป็นอีกประเด็นหนึ่งที่ควรทำการศึกษาต่อไป เนื่องจากแสดงให้เห็นถึงความคงตัวของ vanillin และสัมพันธ์กับปริมาณ vanillin ที่ผลิตได้ใน reaction mixture นอกจากนี้ Shimoni และคณะ (2000) รายงานว่าการใช้ cell free extract ของ *Bacillius subtilis* ให้ผลผลิต vanillin มากกว่า แต่ช้ากว่าการใช้ growing cells และกล่าวว่าเอนไซม์ในชั้นน้ำยังคงมีฤทธิ์ในการเปลี่ยน isoeugenol ไปเป็น vanillin แม้แยกเซลล์ออกไปแล้วก็ตาม การศึกษาโดยใช้ cell free extract จึงเป็นอีกประเด็นหนึ่งที่น่าศึกษาต่อไป

บทที่ 6
สรุปผลการวิจัย

งานวิจัยนี้ทำการศึกษาสภาวะที่มีผลต่อการผลิต vanillin จาก isoeugenol โดยเชื้อ *B. sphaericus* และ *Strep. peucetius* คือ (1) ปริมาณสารตั้งต้น isoeugenol (2) ปริมาณ DMSO ซึ่งใช้เป็นสารช่วยละลาย และ (3) ปริมาณ amberlite XAD-2 resin เพื่อลดผลของ product inhibition ผลการศึกษาพบว่าแม้การใช้สารตั้งต้น isoeugenol ความเข้มข้นสูงจะมีผลให้ได้ผลผลิต vanillin เพิ่มขึ้น แต่ด้วยข้อจำกัดด้านการละลายของ isoeugenol ทำให้ %conversion ที่ได้จากการใช้ isoeugenol ปริมาณต่ำ (5 g/L) ให้ %conversion สูงสุด 36.2 และ 47.7% (วันที่ 10) สำหรับ *B. sphaericus* และ *Strep. peucetius* ตามลำดับ ซึ่ง *Strep. peucetius* ผลิต vanillin ได้มากกว่า *B. sphaericus* ประมาณ 31.6 %

การเติม DMSO เพื่อช่วยละลาย isoeugenol มีผลเพิ่มการผลิต vanillin ทั้งโดยเชื้อ *B. sphaericus* และ *Strep. peucetius* ผลการศึกษาพบว่าปริมาณ DMSO ที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการผลิต vanillin จาก isoeugenol 20 g/L คือปริมาณ DMSO : isoeugenol (โดยน้ำหนัก) เท่ากับ 1:2 สำหรับ *B. sphaericus* และ 1:4 สำหรับ *Strep. peucetius* ซึ่งให้ %conversion สูงสุด 22.7% (วันที่ 11) และ 23.5% (วันที่ 15) ตามลำดับ ซึ่งมากกว่าในระบบที่ไม่เติม DMSO ประมาณ 48.2 และ 46.4% ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างกันสำหรับการผลิตโดยเชื้อทั้งสองชนิด อย่างไรก็ตามเป็นที่น่าสังเกตว่า DMSO มีผลให้การผลิต vanillin ช้าลง

การเติม amberlite XAD-2 เป็นสารดูดซับในระบบมีผลให้ *B. sphaericus* และ *Strep. peucetius* ผลิต vanillin เพิ่มขึ้น และสูงสุดเมื่อเติม amberlite 30% (wet weight) โดยมี %conversion 12.7 และ 16.4% (วันที่ 10) ตามลำดับ อย่างไรก็ตามปริมาณ vanillin ที่วิเคราะห์ได้นี้ยังมีค่าต่ำกว่าระบบที่ไม่เติม amberlite ประมาณ 64.9 และ 65.6% สำหรับ *B. sphaericus* และ *Strep. peucetius* ตามลำดับ ทั้งนี้เนื่องจาก amberlite ซึ่งใช้เป็น resin ต้นแบบ แม้ว่าจะมีประสิทธิภาพในการดูดซับ isoeugenol และ vanillin ได้ดี แต่ปลดปล่อย vanillin จากการชะล้าง amberlite ด้วย ethyl acetate/methanol เพียง 18.6%

เมื่อทำการศึกษาผลร่วมของปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการผลิต vanillin โดยเชื้อ *B. sphaericus* และ *Strep. peucetius* โดยกำหนดใช้ 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 ในอัตราส่วนเท่ากันกับการทดลองนี้สำหรับเชื้อทั้งสองชนิด นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อทั้งสองชนิดผลิต vanillin ได้ช้าลง จึงยังคงเห็นแนวโน้มการเพิ่มขึ้นของ vanillin หลังวันที่ 15 ของการทดลอง

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 ปริมาณมากอาจนำกลับมาใช้ซ้ำหรือผลิตต่อเนื่อง การเติม dimethylsulfoxide เพื่อช่วยละลาย isoeugenol แม้จะช่วยเพิ่มการผลิต vanillin ได้ แต่มีผลให้เชื้อฯ ใช้เวลาในการผลิตยาวนานขึ้น จึงควรวิจัยการเพิ่มการละลาย isoeugenol ด้วยเทคนิคการเพิ่มการละลายอื่นๆ เพิ่มเติม และควรศึกษาชนิดของ adsorbent resin ที่ดูดซับ isoeugenol และ vanillin ได้ดีแต่สามารถชะล้างแยก vanillin ออกมาได้ง่ายด้วย eluting solvent ที่เหมาะสมเพื่อลดการสูญเสียผลผลิต นอกจากนี้ยังควรศึกษาปัจจัยอื่นๆ เพิ่มเติม เช่น การวิเคราะห์หา side products (เช่น vanillic acid, dehydrodyisoeugenol และ isoeugenol-diol) เพื่อศึกษาความคงตัวของสารตั้งต้นและผลิตภัณฑ์ที่ได้ ตลอดจนการใช้จำนวนเซลล์ที่แน่นอน รวมทั้งรูปแบบเซลล์ที่เหมาะสม เช่น การใช้ cell free extract แทน whole cells หรือ growing cells ของจุลินทรีย์ เพื่อช่วยในการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิต vanillin ต่อไป

บรรณานุกรม

Abraham, W.R., Arfmann, H.A., Stumpf, S., Washausen, P., Kieslich, K., 1988. Microbial transformations of some terpenoids and natural compounds. In: Schreier, P. (Ed.), Bioflavour ’87, Analysis, Biochemistry, Biotechnology, Proc. Int. Conf. Walter de Gruyter, Berlin, pp. 399–414.

Bare, G., Gerard, J., Jacques, Ph., Delaunois, V., Thonart, Ph., 1992. Bioconversion of vanillin into vanillic acid by *Pseudomonas* strain BTP9. Appl. Biochem. Biotechnol. 34:35, 499–510.

Buckingham, J., 1994. The Dictionary of Natural Products, third vol. Chapman & Hall, Cambridge.

Budavari, S., O'Neil, M.J., Smith, A., Heckelman, P.E., Kinneary, J.F., 1996. The Merck Index, twelfth ed. Merck & Co., New Jersey, pp. 1693.

Cabral, J.M.S., 2001. Biotransformations. in: Ratledge ,C., Kristiansen, B. (Eds.), Basic biotechnology, second ed. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 471-501.

Cooper, B., 1987. Methods and microorganisms for the preparation of coniferyl aldehyde. Ger. Offen. DE 3,604,874.

Dignum, M.J.W., Kerler, J., Verpoorte, R., 2001. Vanilla production: technological, chemical, and biosynthesis aspects. Food Rev. Int., 17, 199-219.

Evans, W.C., 1992. Trease and Evans’ pharmacognosy, thirteen ed. Bailliere, London.

Faber, K., 1992. Biotransformation in organic chemistry. Springer-Verlage Berlin Heidelberg, Berlin, pp. 1-8, 178-179.

Furukawa, H., Morita, H., Yoshida, T., Nagasawa, T., 2003. Conversion of isoeugenol into vanillic acid by *Pseudomonas putida* I58 cells exhibiting high isoeugenol-degradation activity. J. Biosci. Bioeng. 96, 401-403.

Hopp, R., 1993. Some highlights of H&R research. A review of nearly 120 years of research at Haarmann & Reimer. In: Hopp, R., Mori, K. (Eds.), Recent Developments in Flavor and Fragrance Chemistry. VCH, New York.

Hua, D., Ma, C., Lin, C., Song, L., Deng, Z., Maomy, Z., Zhang, Z., Yu, B., Xu, P., 2007. Biotransformation of isoeugenol to vanillin by a newly isolated *Bacillus pumulus* strain: identification of major metabolites. J. Biotechnol. 130, 463-470.

Hua, D., Ma, C., Song, L., Lin, S., Zhang, Z., Deng, Z., Xu, P., 2007. Enhanced vanillin production from ferulic acid using adsorbent resin. Appl. Microbiol. Biotechnol. 74, 783-790.

Kasana, C.R., Sharma, K.U., Shama, N., Sinha, K.A., 2007. Isolation and identification of a novel strain of *Pseudomonas chlororaphis* capable of transforming isoeugenol to vanillin. Curr. Microbiol. 54, 457-461.

Labuda, I.M., Keon, K.A., Goers, S.K., 1993. Microbial bioconversion process for the production of vanillin. In: Schreier, P., Winterhalter, P. (Eds.), Progress in Flavor Precursor Studies. Allured, USA, pp. 477–482.

Perestelo, F., Falcon, M.A., de la Fuente, G., 1989. Oxidation of vanillin by *Serratia marcescen*s. J. Appl. Bacteriol. 9, 251–254.

Priefert, H., Babenhorst, J., Steinbuchel, A., 2001. Biotechnological production of vanillin. Appl. Microbial. Biotechnol. 56, 296-314.

Shimoni, E., Ravid, U., Shoham, Y., 2000. Isolation of *Bacillus* sp. Capable of transforming isoeugenol to vanillin. J. Biotechnol. 78, 1-9.

Shimoni, E., Baasov, T., Ravid, U., Shoham, Y., 2003. Biotransformations of propenylbenzenes by *Arthrobacter* sp. And its *t*-anethole blocked mutants. J. Biotechnol. 105, 61-70.

Suresh, B., Ritu, T., Ravishankar, G.A., 2006. Biotransformations as application to food industries. in: Shetty, K., Paliyath, G., Pometto, A., Levin, R.E. (Eds.), Food biotechnology, second e3d. Taylor & Francis, Boca Raton (FL), pp. 1656-1690.

Tadasa, K., 1977. Degradation of eugenol by a microorganism. Agric. Biol. Chem. 41, 925–929.

Tadasa, K., Kayahara, H., 1983. Initial steps of eugenol degradation pathway of a microorganism. Agric. Biol. Chem. 47, 2639–2640.

Walton, N.J., Narbad, A., Faulds, C.B., Williamson, G., 2000. Novel approaches to the biosynthesis of vanillin. Curr. Opin. Biotechnol. 11, 490-496.

Washisu, Y., Tetsushi, A., Hashimoto, N., Kanisawa, T., 1993. Manufacture of vanillin and related compounds with *Pseudomona*s. Japan, Patent 52279.

Xue, Y., Liu, Z., Xu, M., Wang, Y., Zheng, Y., Shen, Y., 2010. Enhanced biotransformation of (R,S)-mandelonitrile to (R)-(—)-mandelic acid with in situ production removal by addition of resin. Biochem. Eng. J. 53, 143–149.

Yamada, M., Okada, Y., Yoshida, T., Nagasawa, T., 2007. Biotransformation of isoeugenol to vanillin by *Pseudomonas putida* IE27 cells. Appl. Microbiol. Biotechnol. 73, 1025-1030.

Yamada, M., Okada, Y., Yoshida, T., Nagasawa, T., 2008.Vanillin production using *Escherichia coli* cells over-expressing isoeugenol monooxygenase of *Pseudomonas putida*. Biotechnol. Lett. 30, 665-670.

Zhang, Y., Xu, P., Han, S., Yan, H., Ma, C., 2006. Metabolism of isoeugenol via isoeugenol-diol by a newly isolated strain of *Bacillius subtilis* HS8. Appl. Microbiol. Biotechnol. 73, 771-779.

Zhoa, L.Q., Sun, Z.H., Zheng, P., Zhu, L.L., 2005. Biotransformation of isoeugenol to vanillin by a novel strain of *Bacillus fusiformis*. Biotechnol. Lett. 27, 1505-1509.

Zhoa, L.Q., Sun, Z.H., Zheng, P., He, J.Y., 2006. Biotransformation of isoeugenol to vanillin by *Bacillus fusiformis* CGMCC1347 with the addition of resin HD-8. Process Biochem. 41, 1673-1676.

พนัส บูรณศิลปิน, 2542. ความมหัศจรรย์ของพืช (4). วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี; 14(3): 9-15.

กรมศุลกากร. [homepage on the internet]. กรุงเทพฯ: ธนาคารแห่งประเทศไทย; date unknown [revised 2007 Aug; cited 2007 Oct]. Available from: http: www.bot.or.th/BOTHomepage/Library/print2.asp

ภาคผนวก

การนำเสนอและเผยแพร่ผลงานวิจัย

Aurasorn Saraphanchotiwitthaya, Janya Riunkesorn, Pattana Sripalakit. Effect of dimethyl sulfoxide and isoeugenol on vanillin production by microbial biotransformation. 37th Congress on Science and Technology of Thailand, Centara Grand & Bangkok Convention Centre at Central World, Bangkok, Thailand, October 10-12, 2011. (Poster Presentation)

1. บทคัดย่อ

EFFECT OF DIMETHYL SULFOXIDE AND ISOEUGENOL ON VANILLIN PRODUCTION BY MICROBIAL BIOTRANSFORMAION

Aurasorn Saraphanchotiwitthaya,[1,2,*] Janya Riunkesorn,[2] Pattana Sripalakit [2,3]

[1] Department of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Naresuan University, Phitsanulok, Thailand
[2] Pharmaceutical Biotechnology Research Unit, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Naresuan University, Phitsanulok, Thailand
[3] Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmacognosy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Naresuan University, Phitsanulok, Thailand
*e-mail: aurasorns@nu.ac.th

Abstract: Vanillin (4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde) is widely used in foods, beverages, perfumes, pharmaceuticals and various medical industries. In this study, the biotransformation of isoeugenol to vanillin by *Bacillus sphaericus* ATCC 13805 and *Streptomyces peucetius* var. caesius TISTR 3355 was carried out in 50-mL reaction solution at 30±2 °C, pH 7.5 and 220 rpm. Isoeugenol and vanillin were analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC) technique. Percentage of molar yield of isoeugenol to vanillin was calculated as % conversion. Effect of isoeugenol : dimethyl sulfoxide (1:2, 1:4, 1:6, 1:8 and 1:10) on vanillin production from 20 g/L isoeugenol was studied. The results showed that isoeugenol : dimethyl sulfoxide of 1:2 and 1:4 applying in culture medium of *B. sphaericus* and *Strep. peucetius* gave the similar % conversion, reaching the highest vanillin production approximately 20% (day 11) and 23% (day 15), respectively. Various concentrations of isoeugenol (5, 10, 15 and 20 g/L) were also compared. Using 5 g/L isoeugenol as substrate and solvent, vanillin was produced at the highest % conversion of about 36 and 48% (day 10) by *B. sphaericus* and *Strep. peucetius*, respectively. These findings stated that *Streptomyces peucetius* var. caesius TISTR 3355, isolated strain from Thailand, was a good candidate for biotechnological production of vanillin from isoeugenol under studied conditions. Further investigations for standardization and optimization for higher yield of vanillin production needs to be developed.

Acknowledgements: This work was financially supported by Research Funds from Yearly Budget, Naresuan University (R2553B033), Thailand

Keywords: *Bacillus sphaericus* ATCC 13805, *Streptomyces peucetius* var. caesius TISTR 3355, biotransformation, isoeugenol, vanillin

2. โปสเตอร์เผยแพร่ผลงานวิจัย

EFFECT OF DIMETHYL SULFOXIDE AND ISOEUGENOL ON VANILLIN PRODUCTION BY MICROBIAL BIOTRANSFORMAION

Aurasorn Saraphanchotiwitthaya[1,2,*], Janya Riunkesorn[2], Pattana Sripalakit[2,3]

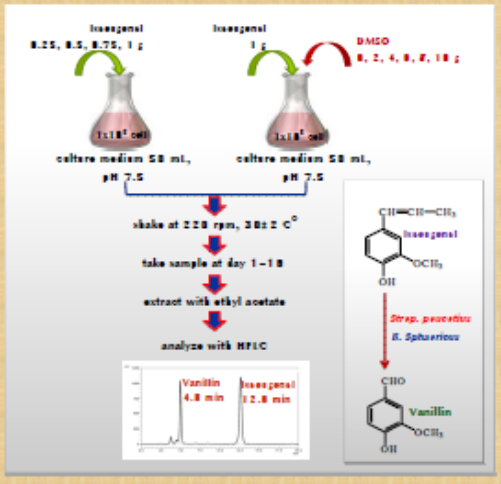
[1]Department of Pharmaceutical Technology, [2]Pharmaceutical Biotechnology Research Unit, [3] Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmacognosy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Naresuan University, Phitsanulok, Thailand, 65000

Introduction

Vanillin (4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde) is widely used in foods, beverages, perfumes, pharmaceuticals, and in various medical industries [1]. Natural vanillin from vanilla pods is relatively expensive and in limited supply. Chemically synthesized vanillin accounts for more than 85% of the total market share [2] but there is an increasing demand for natural vanillin. This has led to the investigation of other routes to obtain this flavor such as the biotechnological production. In this study, the biotransformation of isoeugenol to vanillin by *Bacillus sphaericus* ATCC 13805 and *Streptomyces pseudovulgaris* var. caesius TISTR 3355 with varying amount of dimethyl sulfoxide and isoeugenol is described.

Experimental

The biotransformation of isoeugenol to vanillin by *Bacillus sphaericus* ATCC 13805 and *Streptomyces pseudovulgaris* var. caesius TISTR 3355 was carried out in 50-ml reaction solution at 30±2°C, pH 7.5 and 220 rpm. Effect of isoeugenol : dimethyl sulfoxide (DMSO) (1:2, 1:4, 1:8, 1:5 and 1:10) on vanillin production from 121.5 mM isoeugenol was studied. Various concentrations of isoeugenol (30.5, 60.9, 91.4 and 121.5 mM) were also compared. Isoeugenol and vanillin were analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC) technique. Percentage of molar yield of isoeugenol to vanillin was calculated as %Conversion [3].



[1] Sinha, R., Sabikhi, L., Bhattacharjee, A., 2011. Biotechnological production of vanillin. Appl. Microbiol. Biotechnol. 92, 201–211.
[2] Walton, N.J., Narbad, A., Faulds, C.B., Williamson, G., 2003. Novel approaches to the biosynthesis of vanillin. Curr. Opin. Biotechnol. 14, 490–496.
[3] Yamada, M., Okada, Y., Yoshida, T., Nagasawa, T., 2007. Biotransformation of isoeugenol to vanillin by Pseudomonas putida IE27 cells. Appl. Microbiol. Biotechnol. 73, 1322–1328.
[4] Gnanam, C.I., Kumar, K.R., Dhana, R., Bala, K.A., 2007. Isolation and identification of a novel strain of Pseudomonas chlororaphis capable of transforming isoeugenol to vanillin. Curr. Microbiol. 54, 477–481.

Results & Discussion

The results showed that isoeugenol : DMSO of 1:2 and 1:4 applying in culture medium of *B. sphaericus* and *Strep. pseudovulgaris* gave the similar %conversion, reaching the highest vanillin production approximately 28% (day 11) and 23% (day 15), respectively (figure 1). Using 30.5 mM isoeugenol as substrate and solvent, vanillin was produced at the highest %conversion of about 38 and 48% (day 10) by *B. sphaericus* and *Strep. pseudovulgaris*, respectively (figure 2).

Since the low solubility of isoeugenol in water (at most 8 mM) was disadvantageous to the efficient biotransformation of isoeugenol to vanillin [3]. The addition of DMSO, enhanced its solubility, resulting in higher vanillin productivity. However, the higher concentration of DMSO resulted in the inhibition of vanillin formation. This may be due to the toxicity of DMSO, isoeugenol solubilized by DMSO or vanillin at high concentration to microorganisms and potential degradation of vanillin [4]. Therefore, an appropriate concentration of DMSO and isoeugenol in vanillin production should be concerned. Moreover, vanillin produced by *Strep. pseudovulgaris* was higher than that of *B. sphaericus* indicated that *Strep. pseudovulgaris* having more tolerance to DMSO and isoeugenol.

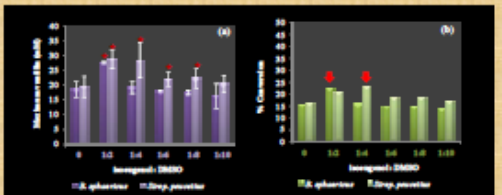


Figure 1 Effects of isoeugenol : dimethyl sulfoxide ratio on biotransformation of isoeugenol to vanillin by *B. sphaericus* and *Strep. pseudovulgaris*. (a) maximum vanillin (mM) (mean±SD, n = 3,*p<0.05), (b) %Conversion

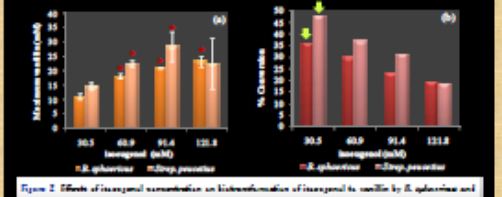


Figure 2 Effects of isoeugenol concentration on biotransformation of isoeugenol to vanillin by *B. sphaericus* and *Strep. pseudovulgaris*. (a) maximum vanillin (mM) (mean±SD, n = 3,*p<0.05), (b) %Conversion

Conclusions

These findings stated that *Bacillus sphaericus* ATCC 13805 and *Streptomyces pseudovulgaris* var. caesius TISTR 3355 were capable of transforming isoeugenol to vanillin. Interestingly, *Strep. pseudovulgaris*, isolated strain from Thailand, was a good candidate for biotechnological production of vanillin from isoeugenol under studied conditions. Addition of appropriate concentration of DMSO and isoeugenol increased vanillin productivity. Further investigations for standardization and optimization for higher yield of vanillin production needs to be developed.

Acknowledgements: This work was financially supported by Research Funds from Yearly Budget, Naresuan University (R2553B033), Thailand.

3. ใบตอบรับเข้าร่วมประชุม

STT37-0129

Science Society of Thailand Under the Royal Patronage of His Majesty the King, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Phya Thai Rd., Bangkok 10330
Tel: 085-018-3131, 02-2527987, 02-2185245 Fax. 02-2527987
E-mail: s_srisung@hotmail.com, kkung.scisoc@gmail.com, jaksriri14@hotmail.com

Acknowledgement

Dear Aurasorn Saraphanchotiwitthaya

The secretariat committee of STT37 would like to inform you that we have received your STT37 registration information for ID: **0129** and e-mail address: **aurasorns@nu.ac.th**
The secretariat committee of STT37 have received

☐Ordinary participant ☑Participant with paper submission

We recieved the payment as ☐cash ☐bank transfered ☐cheque bank
with amount **1,800.00** baht (หนึ่งพันแปดร้อยบาทถ้วน)

Your submitted paper entitiled **EFFECT OF DIMETHYL SULFOXIDE AND ISOEUGENOL ON VANILLIN PRODUCTION BY MICROBIAL BIOTRANSFORMAION**
was reviewed from academic subcommittee of STT with the result:

☑Poster
☐Oral presentation (the presentation schedule ban be checked at the uploaded files)
☐Not accepted

Sincerely yours,

Associate Professor Dr. Thararat Supasiri